

*Estudo do perfil metabólico da caquécia  
cardíaca, através de um modelo animal,  
utilizando  $^2\text{H}_2\text{O}$*

Joana Sofia Rodrigues Barra

Mestrado em Controlo de Qualidade e Ambiente

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*Estudo do perfil metabólico da caquécia  
cardíaca, através de um modelo animal,  
utilizando  $^2\text{H}_2\text{O}$*

Joana Sofia Rodrigues Barra

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em  
Química, ramo de Controlo de Qualidade e Ambiente**

**Orientadores**

Professora Dr.<sup>a</sup> Madalena Caldeira

Professor Dr. John Jones

**Setembro de 2010**

**Universidade de Coimbra**

*“Somos todos protagonistas da nossa existência e, muitas vezes, são os heróis anônimos que deixam as marcas mais duradouras.”*

**Paulo Coelho**

## Agradecimentos

Quero aqui expressar a minha gratidão para com todos os que, directa ou indirectamente, me ajudaram a concretizar este mestrado, nomeadamente:

*À Professora Doutora Madalena Caldeira*, pelo enorme apoio, paciência e incentivo que sempre demonstrou, e por todos os conhecimentos que me transmitiu, que foram fundamentais para a superação de todos os obstáculos.

*Ao Professor Doutor John Jones*, pela simpatia e boa disposição com que sempre me recebeu, e pela partilha de todos os seus conhecimentos, sempre de uma forma simples e até, por vezes, divertida, que me ajudaram a simplificar todos os problemas e a resolvê-los.

*Às minhas colegas de laboratório*: Francisca, Dra. Cristina, Ana Rita e Vanessa, pelo seu companheirismo, auxílio e disponibilidade, e também por todos os momentos divertidos partilhados.

*A todos os meus colegas de curso*, pela compreensão e amizade, que foram bastante determinantes para mim, e por todos os bons momentos de convívio, que sempre ajudaram a animar os meus dias.

*À minha irmã e ao meu cunhado*, pelo apoio e carinho que sempre demonstraram.

Aos *meus pais*, exemplo de força e de coragem, quero agradecer por tudo! Por serem quem são e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Obrigado pelo esforço e dedicação... tudo o que hoje sou a eles devo! Obrigado por todo o apoio e por me terem ajudado a nunca desanimar, apesar de todas as contrariedades! Obrigado por me mostrarem que com esforço se alcançam sempre os objectivos! Toda a alegria que sinto em atingir esta etapa só faz sentido ao partilhá-la convosco.

À *restante família* pela força que sempre me inculcaram.

Ao *André*, ombro amigo em todas as horas e ouvinte atento de todas as preocupações, um obrigado do tamanho do mundo! Obrigado pela incansável presença e pelo apoio incondicional, que foram determinantes na superação de todas as tristezas e decepções! Obrigado por teres sido meu companheiro de luta e por teres estado sempre ao meu lado quando mais precisei! Obrigado pelo teu carinho e compreensão... e acima de tudo obrigado por existires na minha vida!

Sem vocês não teria conseguido!

Muito obrigado a todos!

# Índice

Agradecimentos .....	i
Índice .....	iii
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
 <b>Capítulo 1. Introdução</b> .....	 2
1.1. Metabolismo .....	2
1.1.1. Metabolismo das proteínas .....	8
1.1.2. Metabolismo dos aminoácidos .....	10
1.2. Glutamina e Glutamato: funções e metabolismo .....	14
1.3. Caquécia: a síndrome final .....	18
1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	23
1.5. Quantificação da Glutamina/Glutamato utilizando espectroscopia de $^1\text{H}$ e de $^2\text{H}$ RMN .....	28
1.6. Objectivos principais do estudo .....	30
 <b>Capítulo 2. Materiais e Métodos</b> .....	 33
2.1. Materiais .....	33
2.2. Métodos .....	34
2.2.1. Tratamento dos animais .....	34

2.2.2. Extracção e isolamento do glutamato e da glutamina a partir do tecido hepático .....	36
2.2.2.1. Extracção dos aminoácidos .....	36
2.2.2.2. Isolamento do glutamato hepático .....	38
2.2.2.3. Isolamento da glutamina hepática .....	39
2.2.3. Análise e caracterização das amostras utilizando espectroscopia de $^1\text{H}$ e $^2\text{H}$ RMN .....	41
2.2.3.1. Análise das BW por espectroscopia $^2\text{H}$ RMN .....	41
2.2.3.2. Análise do glutamato hepático por espectroscopia $^1\text{H}$ e $^2\text{H}$ RMN .....	43
2.2.3.3. Análise da glutamina hepática por espectroscopia $^1\text{H}$ RMN.....	48
<b>Capítulo 3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>51</b>
3.1. Análise do enriquecimento em $^2\text{H}$ das BW .....	51
3.2. Análise do enriquecimento posicional em $^2\text{H}$ do glutamato hepático .....	51
3.3. Análise do enriquecimento posicional em $^2\text{H}$ da glutamina hepática.....	62
<b>Capítulo 4. Conclusão .....</b>	<b>66</b>
<b>Trabalho Futuro .....</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 5. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>70</b>

## **Lista de Siglas e Abreviaturas**

**Acetil CoA:** Acetil Coenzima A

**ATP:** Adenosina-trifosfato

**BW:** *Body water*

**CC:** Caquécia Cardíaca

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**FNT:** Factor de Necrose Tumoral

**HAP:** Hipertensão Arterial Pulmonar

**ICC:** Insuficiência Cardíaca Crónica

**MCT:** Monocrotalina

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

**PCA:** Ácido Perclórico

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**TMS:** Tetrametilsilano

**<sup>1</sup>H:** Prótio

**<sup>2</sup>H:** Deutério

**<sup>1</sup>H RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de protão

**<sup>2</sup>H RMN:** Ressonância Magnética Nuclear de Deutério

**<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O:** Água Deuterada



## Resumo

A *Caquécia Cardíaca* é uma condição decorrente de um estado avançado da insuficiência cardíaca, caracterizada por uma mudança em toda a actividade metabólica do corpo, que conduz a um saldo nutricional negativo e à perda de massa proteica corporal. Como a caquécia cardíaca avançada está associada a uma alta taxa de mortalidade, existe um grande interesse no desenvolvimento de marcadores, que permitam elaborar um diagnóstico, ainda numa fase inicial, onde as intervenções são mais eficazes. A perda de proteína corporal envolve, supostamente, um aumento da exportação de aminoácidos proteolíticos, do músculo para o fígado, o que leva a que a determinação da contribuição deste fluxo para a selecção de aminoácidos hepáticos, seja uma boa proposta para um novo método de detecção desta condição.

O glutamato e a glutamina (glu/gln) estão entre os aminoácidos mais abundantes nas proteínas musculares. O que se estabelece como hipótese, é que na caquécia cardíaca haja um aumento do fluxo de glu/gln, resultante da quebra acelerada das proteínas corporais, no fígado. Para testar esta hipótese, as contribuições das diferentes fontes proteicas para o glu/gln hepáticos, num modelo animal de caquécia cardíaca, são comparadas com as obtidas para animais saudáveis. A metodologia utilizada para determinar estas contribuições envolve a quantificação do enriquecimento em deutério ( $^2\text{H}$ ) do glu/gln hepáticos, após a administração de água deuterada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) ao animal. A síntese de glu/gln a partir de fontes metabólicas resulta no seu enriquecimento em  $^2\text{H}$ , obtido através da  $^2\text{H}_2\text{O}$ , enquanto a síntese de glu/gln a partir de fontes proteolíticas não. Assim, o nível de enriquecimento em  $^2\text{H}$  do glu/gln hepáticos, comparativamente com o da água corporal (*body water* - BW), dá informações acerca das diferentes contribuições, metabólica ou proteolítica.

Em animais saudáveis, os enriquecimentos do glu/gln hepáticos, na posição 3, são semelhantes aos obtidos para as BW ( $2.86 \pm 0.07\%$  vs  $3.08 \pm 0.08\%$ ;  $n=6$ ), indicando que a contribuição de glu/gln não marcados, que provém da proteólise, para o volume total de glutamina hepática foi relativamente baixa ( $7 \pm 2\%$ ,  $n=6$ ). Por outro lado, os animais com caquécia cardíaca apresentam uma forte tendência para uma maior contribuição de glu/gln não marcados ( $27 \pm 3\%$ ,  $n=6$ ,  $p=0.0003$ ), o que é consistente com o facto de haver um maior influxo de glu/gln proteolíticos, que provém da quebra de proteínas.

## Abstract

*Cardiac cachexia* is a condition resulting from advanced heart failure that is characterized by a shift in whole-body metabolic activity and food intake towards a negative nutritional balance and loss of body protein mass. Since advanced cardiac cachexia is associated with a high rate of mortality, there is high interest in developing diagnostic markers of the early stages, where interventions are most effective. The net loss of body protein likely involves an increased export of proteolytic amino acids from muscle to the liver, so determining the contribution of this flux to selected hepatic amino acid pools is proposed to be a novel method for detecting this condition.

Glutamate and glutamine (glu/gln) are among the most abundant amino acid constituents of muscle protein. It is hypothesized that in cachexia, there is an increased flux of glu/gln, resulting from accelerated whole-body protein breakdown, into the liver. To test this hypothesis, the contribution of protein sources to hepatic glu/gln in a rat model of cardiac cachexia was compared to that of healthy rats. The methodology for determining the sources of hepatic glu/gln involves quantifying the  $^2\text{H}$ -enrichment of hepatic glutamine/glutamate following administration of deuterated water ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) to the animal. Synthesis of glu/gln from metabolic sources results in enrichment from  $^2\text{H}_2\text{O}$  while generation of glu/gln from proteolysis does not. Thus, the  $^2\text{H}$ -enrichment level of glu/gln relative to that of body water (BW) informs the relative metabolic and proteolytic source contributions.

In healthy animals, hepatic glu/gln enrichment, in position 3, approached that of BW ( $2.86 \pm 0.07\%$  vs  $3.08 \pm 0.08\%$ ;  $n=6$ ) indicating that the contribution of unlabeled glu/gln derived from proteolysis to the hepatic glutamine pool was relatively low ( $7 \pm 2\%$ ,  $n=6$ ). In comparison, the cardiac cachexia animal models had a strong tendency for a higher contribution of unlabeled glu/gln ( $27 \pm 3\%$ ,  $n=6$ ,  $p=0.0003$ ) consistent with a higher influx of proteolytic glu/gln derived from net protein loss.

# **Capítulo 1 - *Introdução***

## 1. Introdução

Ao longo de uma vida, muitos indivíduos experienciam reduções no peso e/ou alterações na composição corporal. O conceito de peso saudável está frequentemente associado com a longevidade em adultos de meia-idade e, em pessoas saudáveis, é essencialmente deliberado e motivado por impulsos estéticos. Contudo esta equação é alterada quando aplicada a idosos e a pessoas com doenças crónicas<sup>[1]</sup>. Este tipo de doenças, especialmente em estados avançados, resulta frequentemente em reduções e alterações da composição corporal, o que em muitos casos conduz a várias síndromes, muitas delas fatais<sup>[1]</sup>. De facto, são vários os estudos que têm demonstrado a existência de uma relação muito linear entre a massa corporal e a sobrevivência, e muitas vezes, em indivíduos com doenças metabolicamente exigentes, o aumento de peso é indicador de um melhor prognóstico<sup>[2]</sup>. Contudo, este aumento poderá não estar directamente relacionado com a melhoria da situação clínica destes indivíduos, tornando-se, desta forma, crucial o estudo das alterações metabólicas associadas a este tipo de doenças. Para esse efeito, é fundamental conhecer os princípios básicos inerentes ao gigantesco conjunto de reacções químicas, que ocorrem simultaneamente em qualquer célula viva, reacções estas que seguem um padrão que as organiza num processo coerente, denominado *Metabolismo*.

### 1.1. Metabolismo

O *Metabolismo* é o processo global pelo qual os sistemas vivos adquirem e utilizam a energia livre de que necessitam, para realizarem as suas variadas funções<sup>[3]</sup>. É uma actividade contínua, complexa e

altamente organizada. Todo ele está interligado, tendo como funções básicas a obtenção e utilização de energia, a síntese de moléculas estruturais e funcionais, o crescimento e desenvolvimento celular e, por fim, a remoção de produtos de excreção<sup>[4]</sup>. O metabolismo é tradicionalmente dividido em duas grandes categorias: anabolismo e catabolismo.

O anabolismo (*ou biossíntese*) é o conjunto das reacções metabólicas de síntese, em que a energia e os equivalentes redutores libertados pelo catabolismo (basicamente na forma de adenosina-trifosfato – ATP e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - NAD(P)H) são utilizados para a construção de moléculas mais complexas. Estas reacções designam-se reacções anabólicas ou de síntese, e são responsáveis pela produção de nova matéria orgânica nos seres vivos. Em geral, as moléculas mais complexas, que constituem estruturas celulares, são construídas passo a passo a partir de precursores mais simples<sup>[5]</sup>. O anabolismo divide-se em três etapas fundamentais: primeiro, a síntese de precursores (*e.g.* aminoácidos e monossacarídeos), depois a activação destes precursores para formas reactivas usando energia provinda da hidrólise do ATP, e por fim a construção de moléculas complexas, tais como proteínas, a partir destes precursores activados. Tipicamente, as vias anabólicas consomem equivalentes redutores, geralmente na forma de NAD(P)H, o que leva a que o estado de oxidação médio do carbono, pertencente ao produto anabólico, seja menor do que o dos seus precursores.

Por outro lado, o catabolismo (*ou degradação*) é o conjunto das reacções metabólicas que libertam energia. Estas reacções denominam-se reacções catabólicas ou de decomposição/degradação, e são responsáveis pela produção de grandes quantidades de energia livre

(aquando da síntese de ATP), a partir da decomposição ou degradação de moléculas mais complexas (matéria orgânica). As reacções catabólicas são oxidativas e providenciam energia e componentes necessários às reacções anabólicas. Uma característica marcante do catabolismo é que ele converte um grande número das mais diversas substâncias (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) em intermediários comuns, que serão posteriormente metabolizados numa via oxidativa central. Quando o catabolismo supera, em actividade, o anabolismo, o organismo perde peso, o que acontece em períodos de jejum ou doença, mas quando o anabolismo supera o catabolismo, o organismo cresce ou ganha peso. No caso de ambos os processos estarem em equilíbrio, diz-se que o organismo se encontra em equilíbrio dinâmico<sup>[5]</sup>. Ou seja, a estratégia básica do metabolismo é formar ATP, poder redutor sob a forma de NAD(P)H (que transporta dois electrões com um alto potencial, fornecendo desta forma poder redutor nas biossínteses de componentes celulares a partir de precursores mais oxidados) e unidades fundamentais para as biossínteses.

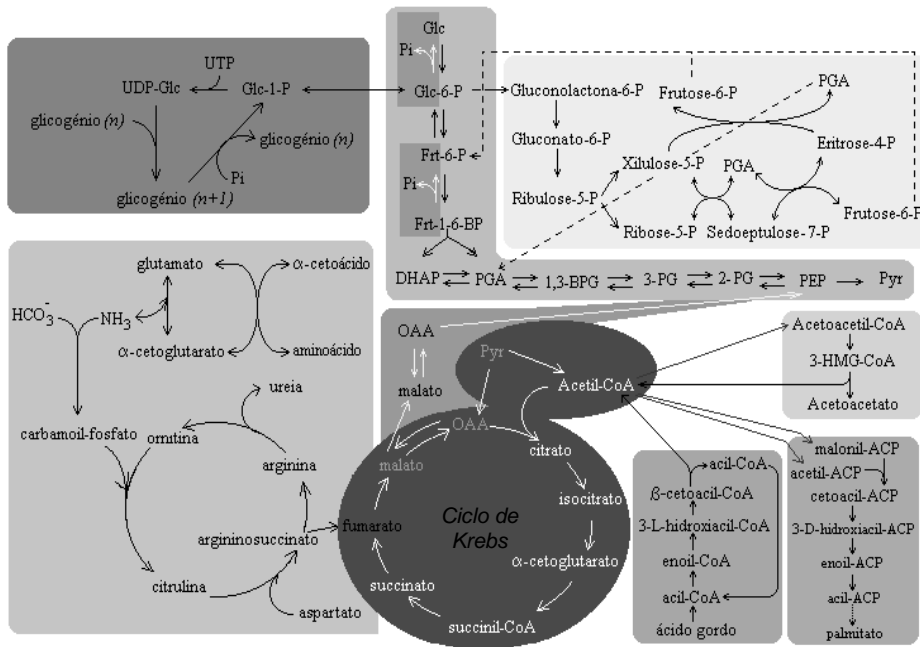
As reacções químicas que integram o metabolismo estão organizadas em vias metabólicas. Estas vias são séries de reacções enzimáticas consecutivas, onde são obtidos produtos específicos<sup>[6]</sup>. Existe uma grande variedade de vias metabólicas, sendo as mais importantes as seguintes:

- A Glicólise: onde se verifica a oxidação da glucose e consequente geração de ATP;
- A Gluconeogénese: onde ocorre a síntese de glucose a partir de moléculas mais pequenas, para posterior utilização pelos vários órgãos;

- O Ciclo de Krebs ou do ácido cítrico: onde ocorre a oxidação da acetil-coenzima A (acetil-CoA) com vista à obtenção de energia;
- A Fosforilação oxidativa: onde se verifica a eliminação dos electrões libertados na oxidação da glucose e da acetil-CoA. Grande parte da energia libertada neste processo pode ser armazenada na célula sob a forma de ATP;
- A Via das pentoses-fosfato: onde ocorre a síntese de pentoses e a obtenção de poder redutor (sob a forma de NAD(P)H) para algumas reacções anabólicas;
- O Ciclo da ureia: onde é eliminada a amónia sob formas menos tóxicas;
- A  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos: onde os ácidos gordos são transformados em acetil-CoA, para posterior utilização pelo ciclo de Krebs.

Todas estas vias metabólicas se relacionam entre si de forma complexa, de modo a permitir uma regulação adequada (Figura 1.1). Este relacionamento envolve a regulação enzimática de cada uma das vias (a enzima que catalisa uma etapa reguladora numa via metabólica é, em geral, o mais importante local de controlo), o perfil metabólico característico de cada órgão e controlo hormonal<sup>[7]</sup>.

A rede complexa das principais vias envolvidas no metabolismo está bem distribuída entre os diferentes compartimentos celulares, e em diferentes órgãos do corpo, que possuem funções metabólicas e habilidades diferentes<sup>[3]</sup>.



**Figura 1.1** – Visão geral das principais vias metabólicas, adaptado da Ref.<sup>[8]</sup>.

Mas como são então supridas as necessidades especiais de alguns órgãos essenciais, e como são coordenadas as suas habilidades metabólicas para alcançar esse fim?

O cérebro normalmente consome grandes quantidades de glucose, e em condições normais esta será o seu único combustível. No caso do músculo, quando se encontra com grande necessidade de ATP (*e.g.* corrida de pouca distância), este degrada glucose e glicogénio anaerobicamente, produzindo lactato que será exportado pelo sangue até ao fígado, onde será reconvertido em glucose (gluconeogénese). Por outro lado, quando o músculo não sente tanta necessidade de ATP (*e.g.* durante actividade moderada) ele gera este composto pela oxidação completa a dióxido de carbono e água, pela intervenção do ciclo de Krebs, da fosforilação oxidativa, da glucose vinda do glicogénio, dos ácidos gordos e dos corpos cetónicos<sup>[5,7]</sup>. O tecido adiposo, em resposta



às necessidades metabólicas do organismo, armazena triglicerídeos e liberta ácidos gordos na circulação. Estas necessidades são fornecidas ao tecido adiposo pela insulina, que indica o estado nutricional no qual o armazenamento é apropriado, pelo glucagon, pela adrenalina e pela noradrenalina, que sinalizam a necessidade de libertação de ácidos gordos para fornecer combustível para outros tecidos<sup>[5]</sup>. Finalmente, no caso do fígado, também conhecido como a “câmara de compensação” metabólica central do organismo, este mantém as concentrações sanguíneas de glucose, armazenando-a na forma de glicogénio quando não necessita dela e libertando-a quando necessita, respectivamente, pela degradação do glicogénio e pela gluconeogénese<sup>[3,5]</sup>. Este órgão também converte os ácidos gordos em corpos cetónicos para serem posteriormente usados pelos tecidos periféricos.

O fígado é indubitavelmente um dos órgãos mais importantes do organismo, sendo a principal unidade de processamento metabólico<sup>[9]</sup>. Possui uma organização estrutural adaptada a todas as suas funções e encontra-se estrategicamente localizado para receber os nutrientes do sangue após terem sido absorvidos no trato intestinal<sup>[7]</sup>. É um órgão que lida com grandes quantidades de aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos e outras moléculas (*e.g.* xenobióticos), constituindo-se, desta forma, uma grande máquina para produzir moléculas energéticas e recursos de armazenamento, funcionando como um “maestro” da homeostase (tendência para manter constantes as condições fisiológicas) do organismo. As principais funções do fígado envolvem a biossíntese de ureia, glutamina, corpos cetónicos, triglicerídeos, colesterol e proteínas do plasma, bem como processos importantes da homeostase da glucose, gluconeogénese, glicogénese, e glicogenólise<sup>[10]</sup>. Além de todas estas principais funções, o fígado

desempenha também um papel importante na mediação de outros metabolismos, nomeadamente no metabolismo das proteínas e, consequentemente, no metabolismo dos aminoácidos.

### 1.1.1. Metabolismo das Proteínas

As proteínas são macromoléculas que exercem papéis cruciais em quase todos os processos biológicos (*e.g.* catálise, transporte, movimento coordenado, controle do crescimento e da diferenciação, *etc.*)<sup>[5]</sup>. Estas formam a classe de macromoléculas biológicas cujas propriedades físico-químicas estão melhor definidas, sendo a principal fonte de azoto nos mamíferos. As proteínas, especialmente no papel de enzimas, catalisam um conjunto complexo de reacções químicas, nomeadamente os diferentes passos das vias metabólicas, actuando como agentes reguladores dessas reacções, de forma concertada e em resposta a mudanças que ocorram no ambiente celular ou a sinais provenientes de outras células<sup>[3]</sup>. São vitais para todo o metabolismo, sendo altamente específicas e com grande poder catalítico, sendo por isso consideradas as “ferramentas” do metabolismo<sup>[9]</sup>.

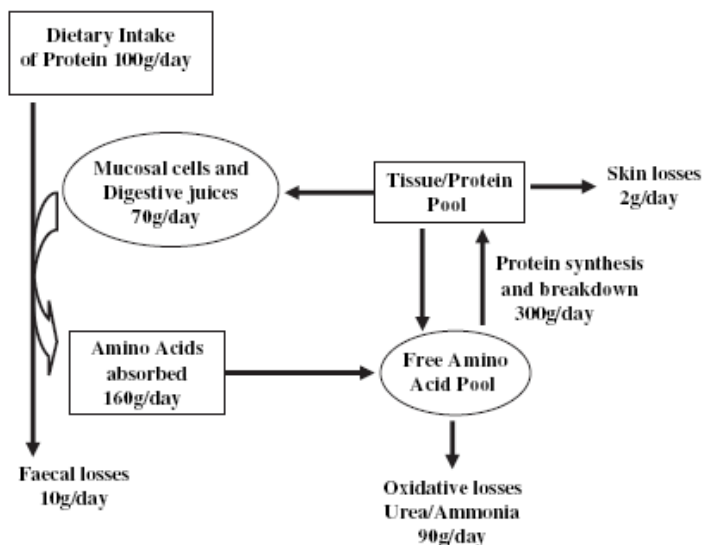
As proteínas constituem cerca de três quartos dos sólidos corporais<sup>[11]</sup>. As que fazem parte da nossa dieta não são as mesmas proteínas requeridas pelo organismo, dado que o intestino não consegue absorver moléculas com tais dimensões, daí que estas proteínas sejam digeridas e fragmentadas nas suas unidades monoméricas constituintes, os aminoácidos, sendo estes posteriormente absorvidos na corrente sanguínea<sup>[5]</sup>. A ingestão de proteínas de alto valor biológico assegura a disponibilidade de aminoácidos no interior das células, que são fundamentais para que ocorra o processo de “*turnover*” (processo

dinâmico durante o qual se verifica continuamente síntese e degradação de proteínas, mantendo-se a concentração constante), a síntese de compostos azotados e a manutenção do equilíbrio do azoto<sup>[3]</sup>.

Todas as proteínas, em todas as espécies, desde bactérias a seres humanos, são constituídas e sintetizadas a partir do mesmo conjunto de vinte tipos de aminoácidos. O grupo carboxilo de um aminoácido liga-se ao grupo amina de outro, estabelecendo-se desta forma ligações entre os vários aminoácidos (ligação peptídica), até à formação de cadeias peptídicas e, conseqüentemente de proteínas. As proteínas apresentam sequências de aminoácidos características, geneticamente estabelecidas, levando a que cada espécie animal tenha as suas próprias proteínas características, garantido assim a sua singularidade<sup>[11]</sup>.

A quantidade de proteína sintetizada por dia depende dos requisitos necessários para o crescimento, para a formação de enzimas e para reposição de proteínas indispensáveis nas células dos vários tecidos. As propriedades características das proteínas levam a que estas apresentem uma vasta gama de funções essenciais, que se tornam evidentes sempre que o organismo esteja em crescimento ou em reparação/substituição de tecidos<sup>[12]</sup>. A natureza dinâmica do metabolismo das proteínas encontra-se ilustrada na Figura 1.2.

O determinante crítico para as funções biológicas de uma proteína é a sua estrutura. De uma forma geral, a função de uma proteína é determinada pela sua conformação (arranjo tridimensional dos átomos), estando as suas propriedades associadas ao elevado número de possíveis combinações entre os diferentes aminoácidos, ou seja, à sequência dos aminoácidos<sup>[3]</sup>.

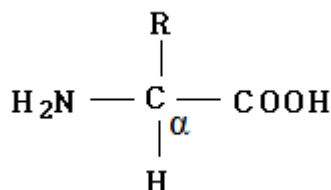


**Figura 1.2** – Dinamismo do metabolismo das proteínas, adaptado da Ref.<sup>[11]</sup>.

### 1.1.2. Metabolismo dos Aminoácidos

Os aminoácidos são o alfabeto da estrutura proteica. Tal como vimos anteriormente, eles são a unidade estrutural básica das proteínas, sendo estas constituídas a partir de vinte aminoácidos “padrão”<sup>[3,5]</sup>. Estas substâncias são habitualmente conhecidas como  $\alpha$ -aminoácidos, porque, com excepção da prolina, todos eles apresentam um grupo amina primário e um grupo carboxilo ligados ao mesmo átomo de carbono, designado carbono  $\alpha$  (Figura 1.3). A esfera de coordenação deste carbono é completada com a presença de uma cadeia lateral (**R**), diferente para os diferentes aminoácidos<sup>[3,5]</sup>.

Todos estes aminoácidos variam consideravelmente nas suas propriedades físico-químicas (*e.g.* polaridade, carácter ácido-base, aromaticidade, tamanho, flexibilidade conformacional, *etc.*)<sup>[9]</sup>.



**Figura 1.3** – Fórmula estrutural genérica para os  $\alpha$ -aminoácidos (forma electricamente neutra).

Na faixa fisiológica de pH, os aminoácidos podem existir em duas formas. Uma pequena fracção encontrar-se-á numa forma electricamente neutra, ou seja, com o grupo amina na forma de  $\text{NH}_2$  e o grupo carboxílico na forma  $\text{COOH}$ , e uma outra fracção, maioritária, encontrar-se-á numa forma ionizada, em que o grupo amina se encontra protonado ( $-\text{NH}_3^+$ ) e o grupo carboxílico desprotonado a carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ), denominando-se esta forma de zwitteriónica (do alemão *zwitter*, que significa "híbrido")<sup>[3]</sup>. Um zwitterião é uma molécula globalmente neutra em termos de carga eléctrica mas que possui cargas locais devido à presença de grupos ionizados. Os vários aminoácidos são normalmente classificados de acordo com as polaridades das suas cadeias laterais R.

Os aminoácidos, além do seu papel como unidades monoméricas das proteínas, são também metabolitos energéticos e precursores para a biossíntese de diversos compostos biologicamente importantes, tais como compostos azotados, aos quais podem fornecer não só o seu azoto mas também, em numerosos casos, os seus átomos de carbono<sup>[13]</sup>. São, ainda, necessários em muitas funções vitais do organismo, sendo normalmente classificados em dois grupos: aminoácidos essenciais e aminoácidos não-essenciais. Aqueles que os mamíferos sintetizam a partir de precursores metabólicos, são os

denominados aminoácidos não-essenciais, e os que necessitam de ser obtidos a partir da dieta são os aminoácidos essenciais<sup>[3]</sup>.

Os aminoácidos em excesso, obtidos da dieta, não podem ser armazenados para utilizações futuras nem ser excretados, sendo convertidos em intermediários metabólicos comuns para utilização como combustível energético no metabolismo<sup>[5]</sup>. A degradação da maior parte destes aminoácidos começa com a remoção das suas aminas  $\alpha$  por transaminação (conduzida pelas aminotransferases), sendo os aminoácidos convertidos nos  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes. As aminas  $\alpha$  são encaminhadas para o  $\alpha$ -cetoglutarato a fim de formar glutamato, que sofre então, desaminação oxidativa, por uma enzima específica, a glutamato desidrogenase, produzindo amónia e regenerando o  $\alpha$ -cetoglutarato<sup>[3,5,9]</sup>. Esta amónia, na maioria dos vertebrados terrestres, converter-se-á em ureia, pela intervenção do ciclo da ureia (Figura 1.4).

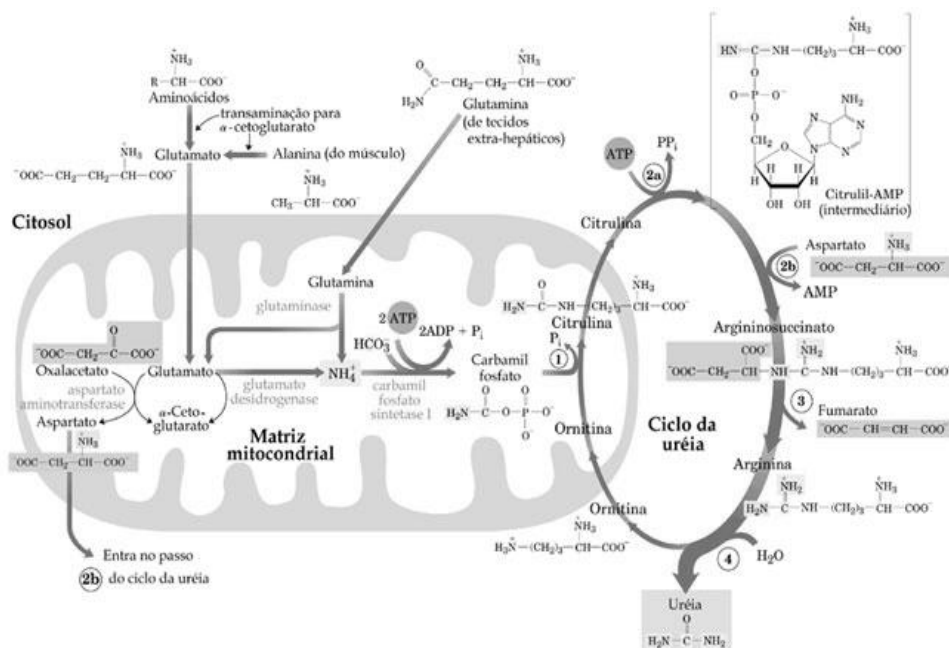


Figura 1.4 – Ciclo da ureia, adaptado da Ref.<sup>[4]</sup>.

O ciclo da ureia consiste em cinco reacções. Este utiliza dois grupos amino, um da amónia e outro do aspartato, e um carbono do anião hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) para formar a ureia, produto final que é excretado do corpo<sup>[5]</sup>. Os átomos de carbono dos aminoácidos degradados são convertidos a intermediários das principais vias metabólicas, nomeadamente, piruvato, acetil-CoA, acetoacetato ou a um intermediário do ciclo de Krebs, funcionando neste caso como reacções anapleróticas adicionais (reacções que formam intermediários numa via metabólica)<sup>[3,7]</sup>.

O ciclo de Krebs, intimamente ligado com o ciclo da ureia (o ciclo da ureia produz, numa das suas reacções intermediárias, o fumarato, que será libertado no citosol da célula, e poderá assim ser utilizado no ciclo de Krebs), é a via final comum de degradação oxidativa<sup>[9]</sup>. Este ciclo também conhecido como ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou como ciclo do ácido cítrico, marca o ponto central do sistema metabólico<sup>[5]</sup>. Ele é o responsável pela maior parte da oxidação dos hidratos de carbono, ácidos gordos e aminoácidos, produzindo simultaneamente numerosos precursores biossintéticos. Ou seja, é um ciclo anfibólico, opera tanto catabólica como anabolicamente<sup>[3,9]</sup>. O ciclo de Krebs é uma série engenhosa de reacções, que oxidam o grupo acetil da acetil-CoA a duas moléculas de dióxido de carbono, de forma a conservar a energia livre libertada para a utilização na produção de ATP<sup>[7]</sup>. Na verdade, a acetil-CoA é uma molécula que se encontra localizada num ponto central estratégico, estabelecendo a ligação entre o metabolismo catabólico e anabólico, sendo também o precursor comum para a oxidação, através do ciclo de Krebs, não só do metabolismo dos aminoácidos, mas de todos os compostos, que possam originar energia<sup>[3,5]</sup>.

O ciclo de Krebs permite, ainda, a oxidação completa da glucose, constituindo o cruzamento dos metabolismos glucídico, lipídico e proteico, permitindo desta forma a oxidação completa, a dióxido de carbono e água, dos ácidos gordos (cujo metabolismo conduz à formação de acetil-CoA) e de aminoácidos, cujo metabolismo conduz à formação de ácido pirúvico (e portanto de acetil-CoA) ou dos próprios intermediários do ciclo<sup>[9]</sup>. Além de tudo isto, este ciclo possibilita ainda, através de reacções de oxidação-redução, a produção da maior parte da energia que o organismo necessita<sup>[6]</sup>.

## 1.2. Glutamina e Glutamato: funções e metabolismo

A glutamina é um aminoácido não essencial extremamente importante, desempenhando um papel vital no metabolismo proteico e na recuperação muscular<sup>[14]</sup>. É o aminoácido mais abundante no plasma e nos tecidos, principalmente no tecido muscular, estando altamente envolvida na transferência de carbono e azoto entre os diferentes órgão e tecidos<sup>[15]</sup>. A sua principal fonte são as proteínas do músculo, sendo este o responsável pela sua libertação e síntese. Contudo, a glutamina não é somente utilizada pelo tecido muscular, mas também, em grande quantidade, por outros sistemas, sendo regularmente produzida pelas células do cérebro e dos pulmões e consumida pelas células do intestino, do sistema imunitários e dos rins<sup>[16]</sup>. Apenas o músculo e o fígado podem simultaneamente sintetizar e utilizar a glutamina, verificando-se um elevado fluxo deste aminoácido entre estes dois órgãos<sup>[14]</sup>. Em situações específicas (*e.g.* stress cirúrgico, jejum, infecções, *etc.*) ocorrem grandes mudanças no fluxo da glutamina. Enquanto as células do sistema imunológico, rins, fígado e intestino demonstrarem uma necessidade acrescida, a concentração intracelular e



plasmática deste aminoácido diminui drasticamente<sup>[17]</sup>. Os níveis de concentração plasmática da glutamina podem decrescer severamente, muitas vezes abaixo da concentração fisiológica, resultando numa situação de desequilíbrio, ou seja numa deficiência de glutamina. Nestas condições, é requerida uma suplementação extra deste aminoácido, levando a que este, apesar de ser classificado como não essencial, seja reclassificado como “condicionalmente essencial”<sup>[16]</sup>.

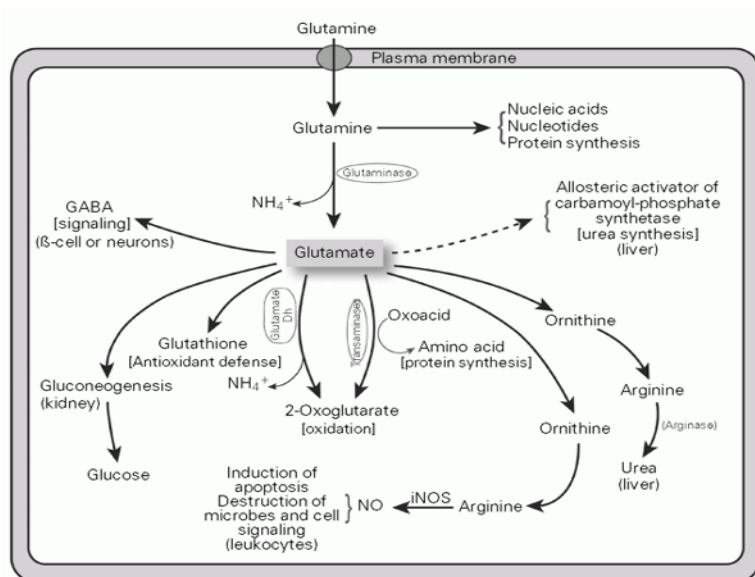
A glutamina exerce diversas funções fundamentais (*e.g.* manutenção do sistema imunológico, controlo do volume celular, *etc.*), sendo também um importante intermediário em várias vias metabólicas<sup>[18]</sup>. Este aminoácido apresenta, simultaneamente, uma elevada importância fisiológica na promoção e manutenção celular, podendo ser sintetizada a partir de outros aminoácidos que são libertados durante a proteólise, nomeadamente a partir do glutamato<sup>[14]</sup>.

O glutamato é o precursor mais directo e mais importante da glutamina, dada a sua abundância nas proteínas do músculo<sup>[19]</sup>. É um aminoácido presente em vários tipos de dietas, quer na forma livre, quer incorporado em peptídeos e proteínas<sup>[14]</sup>. Existe um vasto número de vias envolvidas no metabolismo do glutamato. Este é transformado em alanina nas células da mucosa intestinal e em glucose e lactato no fígado. O glutamato é um dos aminoácidos livres mais abundantes no citosol das células do músculo, tendo um importante papel no metabolismo. Em situações de doença, tal como a glutamina, os níveis deste aminoácido podem ser severamente reduzidos, levando a que haja uma necessidade acrescida da sua utilização<sup>[20]</sup>. O glutamato é simultaneamente o aminoácido livre mais abundante no cérebro, sendo o maior neurotransmissor do sistema nervoso central, bem como precursor de outros neurotransmissores<sup>[14]</sup>. Este aminoácido tem um

papel de “pivô” no metabolismo, estando ligado ao ciclo de Krebs e à gluconeogénese pela acção de enzimas específicas: a glutamato desidrogenase e as transaminases<sup>[21]</sup>. A glutamato desidrogenase é a enzima responsável pela desaminação do glutamato, assim como pela sua síntese a partir do amoníaco e  $\alpha$ -cetoglutarato (intermediário do ciclo de Krebs), enquanto as transaminases, são responsáveis pela catálise da transferência de um grupo amina da posição  $\alpha$  de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido, gerando desta forma um novo aminoácido e um novo  $\alpha$ -cetoácido<sup>[9]</sup>. Ou seja, o glutamato para além de todas as suas funções é, também, o precursor de vários outros aminoácidos que estão envolvidos noutras actividades metabólicas (*e.g.* a prolina, que está envolvida na síntese do glicogénio)<sup>[21]</sup>. Este é o composto através do qual o grupo amina é imediatamente incorporado para a síntese de outros aminoácidos. Contudo esta transferência não ocorre directamente, mas através da glutamina. Em alguns tecidos e células tais como fígado e músculo, o glutamato combina-se com a amónia para produzir glutamina<sup>[17]</sup>. Desta forma verifica-se que o metabolismo da glutamina e do glutamato estão intimamente ligados, estando as suas vias metabólicas devidamente adaptadas. Estas vias são de extrema importância, devido à variedade de papéis metabólicos apresentados por estes dois aminoácidos, que são fundamentais para o funcionamento celular (Figura 1.5).

Existem duas enzimas fundamentais na síntese da glutamina a partir do glutamato, e na respectiva degradação da glutamina a glutamato: a glutaminase e a glutamina sintase<sup>[16]</sup>. A glutamina sintase é uma enzima chave na regulação do metabolismo celular do azoto, que catalisa a conversão de glutamato em glutamina, usando a amónia como fonte de azoto. Por outro lado, a glutaminase é a enzima que

catalisa a hidrólise da glutamina em glutamato e ião amónia<sup>[16]</sup>. Estas duas enzimas estão presentes em todos os organismos.



**Figura 1.5** – Visão geral do metabolismo da glutamina e do glutamato nas células, adaptado da Ref.<sup>[17]</sup>.

A glutamina e o glutamato ocupam, ainda, uma posição destacada no metabolismo dos compostos azotados, constituindo a principal via de entrada do amoníaco nos compostos biológicos, estando o seu metabolismo intimamente ligado ao de outros aminoácidos<sup>[9]</sup>.

O fígado tem um papel de extrema importância na homeostase da glutamina e, conseqüentemente, do glutamato<sup>[19]</sup>. As vias metabólicas presentes no fígado, que utilizam estes dois aminoácidos, encontram-se sempre activas e em equilíbrio. Podem no entanto ocorrer situações específicas em que se verifique um desequilíbrio, tal como foi anteriormente referido, levando a alterações metabólicas graves<sup>[22]</sup>.

Quando estas situações específicas passam de uma simples infecção a um estado de doença crónico, as alterações ao nível do metabolismo são muito severas. Este tipo de doenças, com carácter permanente, leva a que se verifique proteólise excessiva, bem como aumento significativo do catabolismo (hipercatabolismo), o que tem como consequência directa a redução da quantidade de proteínas mobilizáveis e de massa proteica muscular, causando elevada perda de peso que tem, muitas vezes, como consequência directa a caquécia<sup>[16]</sup>. Nestas condições, vai haver uma necessidade acrescida de glutamina/glutamato por parte do organismo, podendo este facto conduzir a um aumento desmedido da produção destes aminoácidos, bem como a um possível aumento do seu fluxo entre o fígado e o músculo, de forma a compensar as suas necessidades<sup>[22]</sup>. Contudo, ao fim de algum tempo, esta condição leva a que haja uma redução no suprimento de glutamina e glutamato ao organismo, conduzindo a alterações na funcionalidade de sistemas vitais<sup>[16]</sup>.

### **1.3. *Caquécia: a síndrome final***

Vários estudos epidemiológicos, da população em geral, têm demonstrado uma forte relação entre o aumento do peso e a sobrevivência. Como a massa corporal média da população continua a aumentar, particularmente nos países industrializados, há um certo alarmismo para todas as doenças relacionadas com a obesidade que se presume que seja a “epidemia” do futuro, a menos que sejam tomadas medidas adequadas. A obesidade traz problemas de saúde graves para as pessoas, nomeadamente a Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP).

A HAP é uma doença grave nas artérias pulmonares (artérias que ligam o coração aos pulmões). À medida que a HAP se desenvolve, o

fluxo sanguíneo através das artérias pulmonares é restringido e o lado direito do coração é colocado sob pressão crescente para bombear o sangue através dos pulmões<sup>[23]</sup>. Esta situação conduz a um aumento progressivo da resistência vascular pulmonar que leva à sobrecarga ventricular direita e, consequentemente a um estado de Insuficiência Cardíaca Crónica (ICC)<sup>[23]</sup>.

A ICC é a via final comum de todas as cardiopatias, sendo o seu principal sintoma a “falta de ar”. Esta doença é o reflexo de uma função cardíaca deteriorada, uma actividade neurohormonal exacerbada e uma disfunção vascular importante. Estes factores culminam com a perda de massa muscular que, quando é muito intensa, é frequentemente designada de caquécia cardíaca (CC)<sup>[24,25]</sup>.

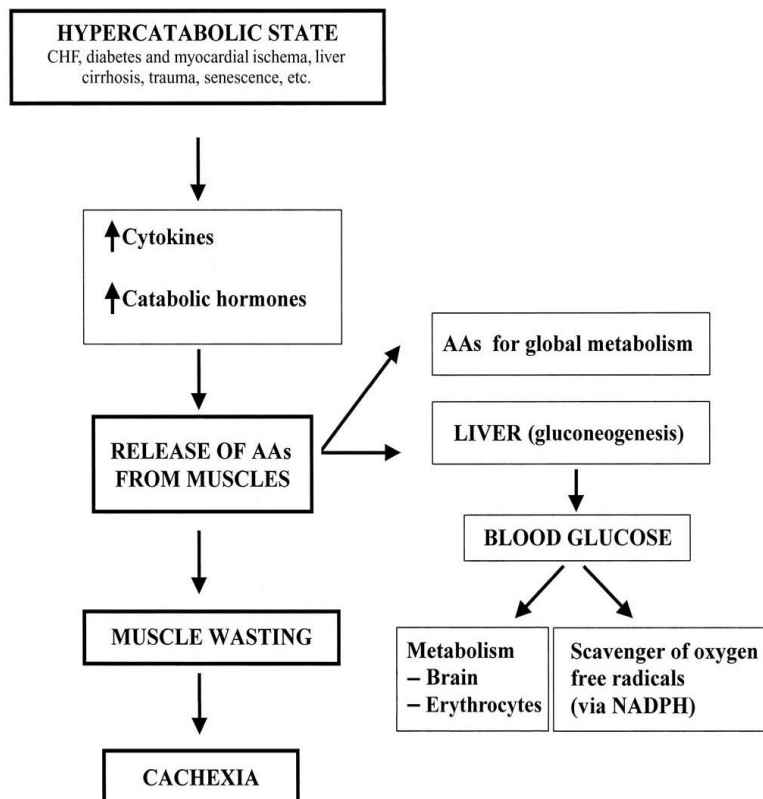
A caquécia (do grego: *kakós* = mau e *hexis* = condição), embora tenha sido descrita há séculos, é uma síndrome que continua a suscitar perguntas, para as quais a ciência clínica possui ainda poucas respostas<sup>[26]</sup>. As alterações fisiopatológicas desta síndrome não estão bem estabelecidas, mas as evidências disponíveis sugerem que a CC seja uma desordem multifactorial neuroendócrina, metabólica e imunológica que culmina com um prognóstico bastante negativo<sup>[27]</sup>. Há um desequilíbrio complexo nos sistemas corpóreos do anabolismo e catabolismo, levando à perda progressiva de peso e a um estado de hipercatabolismo, principalmente no músculo e tecido adiposo<sup>[27,28,29]</sup>. A CC é uma doença que normalmente se encontra associada a um estado terminal, sendo uma importante causa de morte prematura (Figura 1.6)<sup>[30]</sup>.



**Figura 1.6** - Doente em estado avançado de caquécia cardíaca, adaptado da Ref.<sup>[31]</sup>.

Existem vários estudos que associam a CC às citocinas (ou citocinas) pró-inflamatórias e aos seus receptores<sup>[32]</sup>. As citocinas são moléculas solúveis de baixo peso molecular que medeiam a sinalização intercelular e desempenham funções fisiológicas reguladoras muito importantes. São responsáveis pela alteração do metabolismo dos hidratos de carbono, assim como pela existência de uma resistência periférica à insulina<sup>[33]</sup>. Esta resistência leva a que o organismo tenha de se adaptar, no sentido de equilibrar essa alteração, levando a que glucose do fígado seja redireccionada para a massa muscular, e a energia necessária seja fornecida pela oxidação dos aminoácidos essenciais, que contribuem para o balanço negativo do azoto<sup>[32,34]</sup>. Perante um estado hipercatabólico vai ocorrer uma libertação destas citocinas e também de hormonas catabólicas que induzem a libertação de aminoácidos a partir dos músculos, que irão ser utilizados pelo metabolismo global<sup>[13]</sup>. O consumo exagerado destes aminoácidos irá

conduzir a uma elevada perda de massa muscular, que terá como consequência directa a CC (Figura 1.7).



**Figura 1.7** – Representação esquemática das consequências associadas a um estado hipercatabólico, adaptado da Ref.<sup>[13]</sup>.

Os pacientes com ICC associada à CC, apresentam múltiplas alterações no metabolismo energético, proteico, lipídico e dos hidratos de carbono<sup>[35]</sup>. Os portadores destas doenças, metabolicamente exigentes, apresentam níveis plasmáticos elevados do Factor de Necrose Tumoral (FNT), que são provavelmente produzidos em resposta à diminuição do fluxo sanguíneo entre os diversos tecidos e à perda de massa muscular, relacionada com alterações neuro-humorais e

imunológicas. A activação neuro-humoral pode levar à fibrose e à morte celular<sup>[27]</sup>.

Foi ainda demonstrado por alguns investigadores, que este tipo de doentes utiliza a energia de forma ineficiente, sendo o aumento da actividade do ciclo de Cori um dos principais responsáveis pelas perdas energéticas<sup>[36]</sup>. Nesta via metabólica a glucose muscular é convertida em lactato, sendo esta substância, por sua vez, reconvertida em glucose no fígado, à custa de grandes gastos energéticos. Havendo necessidades energéticas aumentadas é necessário activar as vias metabólicas produtoras de energia<sup>[36]</sup>. Uma das fontes de energia é a das proteínas, e no doente caquético há aumento do “turnover” proteico. No entanto, o aumento da síntese e degradação das proteínas também resulta em importantes perdas energéticas, por deficiência da adaptação metabólica à insuficiente ingestão proteico-calórica<sup>[28]</sup>. Nos primeiros dias de jejum há depleção total do glicogénio armazenado no músculo e no fígado. Daqui resulta o recurso à degradação proteica e activação da gluconeogénese hepática para obtenção de glucose, indispensável às células do cérebro e de outros tecidos estritamente dependentes daquele monossacarídeo<sup>[36]</sup>. Verifica-se simultaneamente que os portadores de CC, possuem um balanço de produtos azotados negativo.

Em resumo, existem múltiplos factores que contribuem para a CC, a qual se caracteriza por um conjunto de alterações metabólicas. A nível do metabolismo proteico estas caracterizam-se por: diminuição da massa muscular e da síntese proteica muscular, balanço negativo dos produtos azotados, e aumento da degradação das proteínas musculares, da síntese proteica hepática e da síntese proteica global, ocorrendo estes fenómenos à custa de grandes dispêndios de energia<sup>[34]</sup>. Clinicamente,



estas alterações manifestam-se por atrofia muscular e dos órgãos viscerais, entre outras.

Actualmente não existe um tratamento padronizado para a CC. Alguns tratamentos alternativos foram propostos e são utilizados, como estimuladores de apetite, hormonas de crescimento e suplementos alimentares<sup>[37]</sup>. Do ponto de vista cirúrgico, o transplante cardíaco tem vindo a ter um destaque especial no prognóstico e na reversão parcial da CC<sup>[2,38]</sup>. Contudo esta síndrome continua a ser um grande desafio para os profissionais de saúde. Permanecem ainda muitos tópicos por desvendar, existindo uma grande necessidade de padronização no tratamento destes pacientes. É por tudo isto que se torna fundamental compreender os fenómenos metabólicos associados à CC, e encontrar marcadores metabólicos que nos indiquem precocemente o possível desenvolvimento desta condição, para um possível tratamento que irá permitir um aumento da qualidade de vida dos doentes e possivelmente uma maior sobrevivência<sup>[1,37]</sup>.

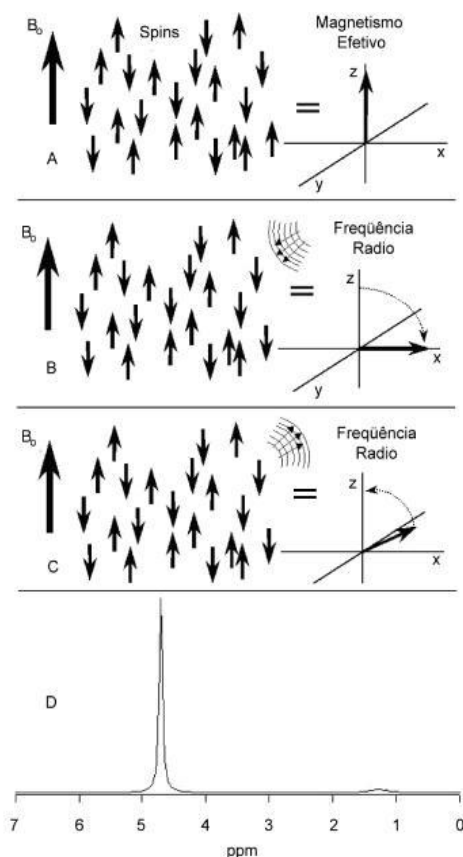
#### **1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é reconhecidamente uma das técnicas mais importantes para a investigação a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria<sup>[39]</sup>. Esta técnica tornou-se igualmente muito útil no estudo de questões conformacionais e configuracionais relativas às estruturas de moléculas biológicas (*e.g.* drogas, proteínas e DNA), e na obtenção de informações anatómicas e metabólicas de sistemas biológicos<sup>[40]</sup>. A espectroscopia de RMN é hoje utilizada de forma generalizada por todos os que se dedicam a

estudar directa ou indirectamente compostos ou fenómenos químicos. É uma técnica analítica sofisticada e poderosa que tem aplicações em diferentes áreas, podendo ser utilizada tanto para análise qualitativa como quantitativa. As suas aplicações vão desde a análise de compostos simples a seres vivos intactos, de um modo não invasivo e não destrutivo, sendo por isso uma técnica que pode ser utilizada tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>[41]</sup>.

A técnica espectroscópica de RMN explora as propriedades magnéticas dos núcleos atómicos activos (*e.g.*  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ), com spin não nulo. Estes núcleos podem ser vistos como pequenos piões com carga que rodopiam em torno do seu eixo, gerando o seu próprio pequeno campo magnético, encontrando-se, normalmente, dispostos de forma aleatória<sup>[41]</sup>. Contudo, quando são colocados sob a influência de um forte campo magnético externo, estes núcleos são obrigados a alinharem-se com orientações específicas, que se caracterizam por terem diferentes níveis energéticos. Posteriormente, quando os núcleos são expostos a uma radiação electromagnética, na frequência rádio, recebem energia, sendo desta forma obrigados a transitar para uma outra orientação, de nível energético superior<sup>[41]</sup>. Esta transição será posteriormente detectada, através da captação de energia emitida quando os núcleos regressam ao estado fundamental, sendo caracterizada por frequências específicas, que ocorrem a velocidades características, dependendo da natureza dos núcleos, da estrutura molecular e da composição da amostra<sup>[40]</sup>. A radiação emitida, quando os núcleos retomam a sua orientação original, gera um sinal eléctrico, que após tratamento matemático (transformada de Fourier simples), torna possível traçar um gráfico da intensidade desse sinal em

função da frequência aplicada, ou seja, um espectro de RMN, em que importa a posição, a intensidade e a forma das bandas (Figura 1.8)<sup>[41]</sup>.



**Figura 1.8** – Esquema representativo da obtenção de um espectro de RMN, desde a aplicação de um campo magnético forte ( $B_0$ ) até à geração do sinal eléctrico, que permitirá a obtenção do respectivo espectro<sup>[42]</sup>.

O espectro de RMN, para um determinado núcleo, varia com a sua vizinhança imediata, sendo possível identificar os picos correspondentes a átomos específicos, mesmo em misturas relativamente complexas<sup>[39]</sup>. Esta informação depende da natureza dos núcleos magnéticos, das características do ambiente electrónico em que os núcleos se encontram imersos e das relações de posição entre

núcleos da mesma molécula. Assim os núcleos magnéticos funcionam como sondas informativas da estrutura molecular<sup>[40]</sup>.

A espectroscopia de RMN é, então, uma técnica que detecta isótopos específicos em função dos seus spins nucleares característicos, permitindo determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto, e consequentemente a obtenção de informação acerca da estrutura de moléculas<sup>[43]</sup>. A análise por espectroscopia de RMN permite medir alguns parâmetros espectrais fundamentais, que possibilitam a aquisição de informação útil acerca do que se pretende estudar (intensidade dos sinais, desvio químico ( $\delta$ ), efeito de acoplamento spin-spin e tempo de relaxação). Contudo, esta técnica não apresenta só vantagens, tendo algumas limitações, nomeadamente a sua baixa sensibilidade, devido às transições magnéticas nucleares serem pouco intensas.

Nos últimos anos têm-se verificado diversos avanços na técnica que permitem contornar este problema, levando a que se verifique a expansão da aplicação da técnica espectroscópica de RMN. Esta assume especial relevância quando associada a estudos de marcação isotópica de átomos específicos, em metabolitos com hidrogénio, que permitem que o percurso metabólico dos núcleos dos átomos marcados, nomeadamente dos núcleos dos isótopos prótio ( $^1\text{H}$ ) e deutério ( $^2\text{H}$ ), seja seguido por espectroscopia de RMN de protão ( $^1\text{H}$  RMN) e de deutério ( $^2\text{H}$  RMN), respectivamente.

A espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN é a mais comumente utilizada. Esta técnica baseia-se na observação directa de núcleos de  $^1\text{H}$  em solução, o que, atendendo às características favoráveis deste núcleo (spin igual a 1/2, elevada abundância e elevada razão giromagnética), irá possibilitar as medições de alta sensibilidade e baixo tempo de

aquisição para este núcleo, levando a que esta técnica tenha um vasto número de aplicações. Atendendo a que a maior parte dos metabolitos contêm hidrogénios, e, consequentemente, uma grande quantidade de  $^1\text{H}$  (dado que é o isótopo mais abundante), a espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN torna-se uma poderosa técnica para observar, identificar e quantificar um grande número de metabolitos biologicamente importantes. Devido à sua alta sensibilidade o núcleo de  $^1\text{H}$  é apropriado para estudos *in vivo* por RMN<sup>[40]</sup>.

Por outro lado a espectroscopia de  $^2\text{H}$  RMN, utiliza um outro isótopo importante em estudos metabólicos, o  $^2\text{H}$ . Uma vez que a sua abundância natural é muito menor (~0.015%) do que a do  $^1\text{H}$  (> 99.9%), este é frequentemente negligenciado. O  $^2\text{H}$  tem um núcleo com spin igual a 1 ( $I=1$ ), que apresenta momento quadrupolar e, consequentemente, tempos de relaxação muito curtos<sup>[40]</sup>. Este fenómeno de relaxação rápida faz com que muitas vezes os sinais em RMN não apareçam tão bem resolvidos como seria desejado, dado que eles são intrinsecamente mais largos do que os sinais correspondentes que aparecem em  $^1\text{H}$  RMN. Além disso, o núcleo de  $^2\text{H}$  possui uma razão giromagnética baixa, comparativamente com o  $^1\text{H}$  (~15% de  $^1\text{H}$ ), o que leva a que este entre em ressonância a 76.7 MHz, em vez de 500 MHz, num campo de 11.75T. Isto significa que uma diferença de 1 ppm entre dois sinais de  $^2\text{H}$  adjacentes será apenas 76.7 Hz, enquanto entre dois sinais de  $^1\text{H}$  será 500 Hz, levando a que se verifique maior proximidade entre os sinais de  $^2\text{H}$ , em termos de frequência absoluta, comparativamente com os sinais de  $^1\text{H}$ . Ou seja, para campos magnéticos baixos, existem dificuldades acrescidas, dado que os sinais que se situam muito próximos não permitem uma boa distinção entre eles.

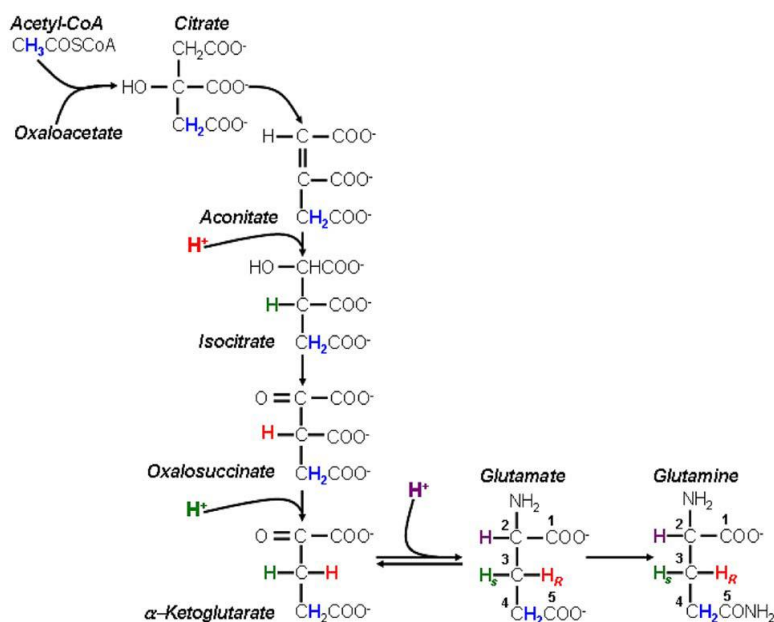
Quando marcadores isotópicos são incorporados em metabolitos e administrados a um sistema metabólico, as suas vias podem ser seguidas pela distribuição da marcação nos intermediários. Por exemplo, utilizando um marcador deuterado, como água deuterada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ), os diferentes posicionamentos de  $^2\text{H}$  numa molécula de interesse (*e.g.* intermediário metabólico) poderão ser associados a diferentes fluxos das vias metabólicas<sup>[15]</sup>. Assim a espectroscopia de  $^2\text{H}$  RMN permite a avaliação da constituição das diferentes vias metabólicas, através da quantificação dos diferentes enriquecimentos posicionais em  $^2\text{H}$ .

### **1.5. Quantificação da Glutamina/Glutamato utilizando espectroscopia de $^1\text{H}$ e de $^2\text{H}$ RMN**

A ressonância magnética nuclear de isótopos estáveis, tem provado ser uma técnica muito boa e precisa na quantificação dos diferentes tipos de moléculas em amostras biológicas<sup>[40]</sup>. Esta técnica pode avaliar, simultaneamente, em qualquer amostra, as variações nas concentrações e as diferenças na incorporação de isótopos estáveis de vários metabolitos específicos (*e.g.* glutamina e glutamato)<sup>[44]</sup>.

A marcação específica de metabolitos, de modo a que as suas interconversões possam ser seguidas, é uma técnica de extrema importância. Existem muitas referências bibliográficas que fundamentam a administração de  $^2\text{H}_2\text{O}$ , para o seguimento das vias metabólicas do fígado<sup>[45]</sup>. A  $^2\text{H}_2\text{O}$  é preferível a outros marcadores, pois é um marcador seguro e não-radioactivo, mantendo o enriquecimento do precursor com facilidade. Quando a água corporal (BW - *body*

water) é enriquecida com  $^2\text{H}_2\text{O}$  por umas horas, verifica-se um enriquecimento posicional em  $^2\text{H}$ , dos vários hidrogénios pertencentes aos aminoácidos livres. Em muitos casos, este enriquecimento ocorre através de uma alteração metabólica específica, o que poderá fornecer informações acerca dessa mesma alteração. Atendendo a este facto, o que se estabelece como uma hipótese possível, é que a glutamina que provém do ciclo de Krebs, por via cataplerótica, tenha enriquecimentos posicionais em  $^2\text{H}$ , nas posições 2, 3 e 4, evidenciando desta forma a incorporação dos hidrogénios da  $^2\text{H}_2\text{O}$ , através de enzimas específicas do ciclo de Krebs e por aaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato, permitindo desta forma analisar a contribuição desta via metabólica para a glutamina hepática, e consequentemente para o glutamato hepático (Figura 1.9)<sup>[15]</sup>.



**Figura 1.9** – Esquema representativo do enriquecimento posicional em deutério ( $^2\text{H}$ ) do glutamato e da glutamina, nas posições 2, 3 e 4, após a administração de  $^2\text{H}_2\text{O}$ , adaptado da Ref.<sup>[15]</sup>.

A partir do momento em que os átomos de hidrogénio marcados são incorporados nos metabolitos desejados, durante a biossíntese, a  $^2\text{H}_2\text{O}$  passa a ser equivalente a um substrato de um precursor marcado. Esta marcação apresenta algumas vantagens sobre substratos marcados, nomeadamente a sua distribuição rápida e equilíbrio com água corporal total<sup>[45]</sup>, podendo ser posteriormente analisada e quantificada por espectroscopia de  $^1\text{H}$  e de  $^2\text{H}$  RMN.

## 1.6. Objectivos principais do estudo

O presente estudo, teve como objectivo principal a quantificação do enriquecimento posicional em  $^2\text{H}$  da glutamina/glutamato hepáticos, utilizando a espectroscopia de RMN. Esta quantificação, utilizando a  $^2\text{H}_2\text{O}$  como marcador deuterado, permite “acompanhar” as marcações posicionais nos respectivos hidrogénios (posições 2, 3 e 4) da glutamina/glutamato hepáticos, ao longo das vias metabólicas em que estes participam. Desta forma, será possível compreender de que forma é que alterações que ocorram ao nível destas vias estão relacionadas, ou não, com o aparecimento de determinadas doenças, nomeadamente a CC.

Para a concretização do respectivo objectivo, foi efectuado um estudo com fígados de ratos wistar (alimentados), tendo estes sido previamente injectados com  $^2\text{H}_2\text{O}$  e monocrotalina (MCT). A MCT é uma droga que vai induzir o aparecimento de HAP nos animais, levando ao aparecimento de hipertrofia ventricular direita, e consequentemente, ICC<sup>[46,47]</sup>. Após a ICC, alguns destes animais irão desenvolver CC, tal como acontece nos seres humanos, levando a que constituam um excelente modelo animal para a investigação da CC.



Para a análise da glutamina/glutamato hepáticos, os fígados, anteriormente referidos, foram submetidos a um completo processo de extracção e isolamento, previamente estabelecido e aperfeiçoado, com a finalidade de se poderem estudar estes aminoácidos isoladamente.

A realização de todo o tratamento aplicado nos animais, bem como todo o processo de sacrifcação, foi efectuado por um grupo de investigadores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, cuja colaboração foi essencial em todo o decorrer do estudo.

## **Capítulo 2 - *Materiais e Métodos***

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Materiais**

A realização dos diferentes métodos, que serão descritos neste capítulo, requereu uma lista de materiais específicos.

Para a extracção dos aminoácidos a partir do tecido hepático, foi utilizado o ácido perclórico (PCA), 70%, fornecido por Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.). O ajuste de pH, durante o processo de extracção, foi efectuado utilizando hidróxido de potássio (KOH), fornecido por Panreac (Barcelona, Espanha).

A separação dos aminoácidos, e consequente isolamento, tornou necessário a utilização de uma sequência, previamente estabelecida, de colunas cromatográficas. O acondicionamento destas colunas foi feito utilizando dois tipos de resinas de troca iónica: a Dowex-50WX8-200- $H^+$ , para troca catiónica, e a Dowex-1-acetate, para troca aniónica, ambas fornecidas por Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.). Para a eluição dos diferentes aminoácidos, e de acordo com o tipo de resina utilizada, de troca catiónica ou de troca aniónica, foi utilizado, respectivamente, o hidróxido de amónia ( $NH_4OH$ ), 25%, fornecido por Baker Analyzed (Phillipsburg, E.U.A.) e o ácido acético ( $CH_3COOH$ ), 96%, fornecido por Riedel-de Haen (Seelze, Alemanha). Para a hidrólise da glutamina, efectuada entre a sequência das colunas cromatográficas, foi utilizado ácido clorídrico (HCl), 25%, fornecido por Riedel-de Haen (Seelze, Alemanha).

A aquisição dos espectros de  $^1H$  e  $^2H$  RMN do glutamato, foi efectuada utilizando como padrão interno o dimetilsulfóxido parcialmente deuterado (DMSO, com 0.530% de enriquecimento em  $^2H$ ), fornecido por Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.), e a dissolução

das fracções biológicas (fracções de glutamato), foi efectuada utilizando como solvente “água empobrecida em deutério” ( $^2\text{H}$  depleted water), fornecida por Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover Massachusetts, E.U.A.). No caso dos espectros  $^1\text{H}$  RMN da glutamina, estes foram obtidos utilizando como padrão interno uma solução aquosa de Formato de Potássio (0,3398 mmol/ 1g solução), fornecido por Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.), e como solvente  $^2\text{H}_2\text{O}$  (99,87%), fornecida por CortecNet (Voisins-Le-Bretonneux, França).

Os espectros de  $^2\text{H}$  RMN das BW, foram obtidos utilizando como padrão interno, e simultaneamente como solvente, a acetona ( $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ ), fornecida por José Manuel Maria dos Santos, Lda (Lisboa, Portugal) .

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Tratamento dos animais

O estudo do perfil metabólico da caquécia cardíaca teve como base um modelo animal. Para a concretização deste modelo foi utilizado um grupo de ratos wistar adultos, todos machos, (Charles-River, Barcelona, Espanha), cujos pesos se encontravam entre 180g e 200g. Estes animais foram alojados em gaiolas, em grupos de cinco, tendo sido mantidos num ambiente controlado: sala a uma temperatura constante de 22°C, com um ciclo de 12h de luz e 12h de escuridão, com acesso *ad libitum* a água e comida. Após o alojamento, os animais foram injectados subcutaneamente, de forma aleatória, com MCT (60 mg/kg) ou com igual volume de uma solução salina (1 ml/kg). Vinte e sete dias após a injeção subcutânea, estes animais foram novamente

injectados, via intra-peritonal (via i.p.), com um volume de 99.9% de água deuterada, contendo 0.9% de cloreto de sódio (NaCl), que corresponde a 3% do volume de água corporal (teoricamente, se 70% do peso do animal for água e a percentagem de enriquecimento em  $^2\text{H}$  da BW, que se pretende, for 3%, então o volume que deve ser administrado via i.p. será  $\text{peso} \times 0.70 \times 0.03$ ). A água de beber foi simultaneamente enriquecida com água deuterada (3% de enriquecimento). Decorridas 24h após a injeção de água deuterada, e encontrando-se sob privação de alimento, durante todo este período, os animais são sacrificados (depois de pesados, anestesiados com pentobarbital de sódio, 6mg/100mg, e injectados por via intravenosa com cloreto de potássio), sendo o seu fígado rapidamente removido e colocado em azoto líquido (processo de *freeze-clamped*), a fim de parar o metabolismo. O fígado será armazenado a uma temperatura de  $-80^\circ\text{C}$ . Simultaneamente, é retirada uma amostra de sangue (cerca de 1mL), que será posteriormente centrifugada para ocorrer a separação do plasma, sendo esta também armazenada a baixas temperaturas, para evitar contaminação e a diluição do deutério, que poderia levar uma a sobrestimação do enriquecimento em  $^2\text{H}$  da BW.

No presente trabalho, atendendo à reduzida taxa de sobrevivência dos animais, foram apenas conseguidas doze amostras de fígado, com cerca de um grama cada, provenientes de doze animais diferentes, sem conhecimento prévio do grupo a que cada uma destas amostras pertencia, ou seja, ao grupo dos animais injectados com MCT (doentes) ou ao grupo dos animais injectados com a solução salina (controlo).

O tratamento dos animais foi realizado, integralmente, no laboratório do Professor Doutor Roberto Roncon-Albuquerque,

localizado na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, que é uma instituição governamental com permissão para executar pesquisa animal, tendo sido todas as experiências, efectuadas de acordo com a lei portuguesa de protecção animal e de acordo com os procedimentos éticos estabelecidos no guia para o tratamento e uso de animais em laboratório (*“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”*, publicado por US National Institutes of Health - NIH).

### **2.2.2. Extracção e isolamento do glutamato e da glutamina a partir do tecido hepático**

Quando se trabalha com uma amostra biológica, é de extrema importância ter em consideração a natureza dos metabolitos que se pretende extrair, isolar e purificar. O conhecimento do comportamento químico de cada molécula em solução (aquosa ou em solventes orgânicos) é o ponto de partida para a correcta definição da melhor metodologia a aplicar, evitando, desta forma, perdas de amostra e contaminações a vários níveis, permitindo um melhor rendimento na extracção.

#### **2.2.2.1. Extracção dos aminoácidos**

Para a realização do processo de extracção dos aminoácidos, presentes no tecido hepático, o primeiro passo a executar é a liofilização das amostras (com cerca de 1g), pertencentes aos fígados anteriormente removidos e armazenados a -80°C. Este processo ocorre durante cerca de 48h (este período de tempo poderá variar de acordo com a amostra), e tem como objectivo a remoção de toda a composição

líquida. Depois de liofilizadas, as amostras serão pesadas, colocadas em falcons e guardadas num excicador (para que não haja uma possível absorção de água), ficando prontas para a realização do processo de extracção com PCA. Este processo permite a extracção de metabolitos solúveis em água, a partir da maioria dos tecidos, incluindo o glutamato e a glutamina, que são os metabolitos que se pretendem analisar.

A extracção com PCA começa com a obtenção de um pó, resultante da trituração das amostras de fígado, utilizando o vortex ou, caso este não resulte, uma espátula. A utilização da espátula implica rapidez, para evitar a absorção de água por parte das amostras, devendo abrir-se rapidamente o falcon, partir-se a amostra e fechar novamente, o mais rápido possível. Este falcon vai novamente ao vortex. Em seguida, adicionam-se 10 mL/g de PCA 3.5% (v/v) a cada falcon, mistura-se tudo no vortex, e centrifuga-se a solução resultante a 3000 rpm, durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante ácido é cuidadosamente vertido para um copo, colocado sob agitação com o auxílio de um agitador magnético, sendo neutralizado com KOH (diferentes concentrações) até pH 6.7-7.3. A neutralização é um passo de extrema importância para uma correcta análise por espectroscopia de RMN, dado que um simples desvio na gama de pH, poderá causar grandes danos nas amostras durante o processo de liofilização (pH baixo) ou interferir significativamente na qualidade do espectro de RMN (pH alto). O extracto neutralizado é, então, colocado no frigorífico durante 1h, a fim de se precipitarem todos os sais. Após o repouso no frio, o sobrenadante é novamente colocado num falcon e o precipitado é colocado num eppendorf, sendo este último centrifugado a 3000 rpm, durante 5 min. O sobrenadante resultante, desta última centrifugação, será adicionado ao falcon, sendo a solução final

novamente centrifugada a 3000 rpm, durante 5 min. Por fim, obtém-se novamente um precipitado (perclorato de potássio) e um sobrenadante (contendo os aminoácidos), sendo este último submetido a um processo de liofilização, durante 24h-48h. O sobrenadante liofilizado será novamente dissolvido em 3mL de água destilada, sendo esta solução a que irá ser utilizada nos subseqüentes passos de todo este procedimento.

#### **2.2.2.2. Isolamento do glutamato hepático**

O isolamento do glutamato hepático só será possível após a completa separação dos sais e dos aminoácidos, presentes na solução anterior. Para esse efeito, esta solução será passada numa coluna cromatográfica de troca catiónica. Esta coluna é preenchida com 10 g de resina Dowex-50WX8-200-H<sup>+</sup>, sendo posteriormente lavada com água destilada até a um pH $\geq$ 5 (pH da água destilada). Após a obtenção deste valor de pH, verte-se lentamente a solução anterior (contendo os aminoácidos) para dentro da coluna. Depois de vertida toda a solução, lava-se novamente a resina com água destilada até pH $\geq$ 5. Esta água de lavagem conterà todas as espécies neutras e aniónicas, enquanto as espécies catiónicas, incluindo os aminoácidos, estarão retidas na coluna. Para a eluição dos aminoácidos retidos, adicionam-se 40mL de NH<sub>4</sub>OH 2M, e verifica-se se o pH final do efluente da coluna se encontra superior a nove. Esta solução é evaporada até um volume final de 0-5mL, e novamente dissolvida em 2mL de água destilada, para se proceder à separação do glutamato dos restantes aminoácidos. Para isso, esta última solução será passada numa coluna cromatográfica de troca aniónica. Esta coluna é preenchida com 2g de resina Dowex-1-



acetate, sendo posteriormente lavada com água destilada. A solução anterior é então aplicada à coluna. No final, a resina será novamente lavada com 10mL de água destilada, que, simultaneamente servirá como eluente a todos os aminoácidos, excepto o glutamato (esta solução será guardada para posterior utilização no processo de isolamento da glutamina). O glutamato irá ficar retido na coluna, dado que, pelo facto de ser um aminoácido ácido, nas presentes condições ele encontrar-se-á numa forma aniónica. Para se proceder à eluição deste aminoácido, adiciona-se à coluna de troca aniónica 5mL de ácido acético, sendo a solução final posteriormente evaporada.

Após esta fase, embora o glutamato já se encontre isolado, é ainda necessário remover todos os vestígios de ácido acético que poderão estar presentes na amostra, dado que este composto apresenta sinais em RMN muito próximos dos que queremos analisar, podendo influenciar os resultados. Para isso, foi feita mais uma coluna de troca catiónica, preenchida com 1g de Dowex-50WX8-200- $H^+$ . Esta é lavada com água destilada até  $pH \geq 5$ , sendo posteriormente aplicada à coluna a solução anterior (contendo o glutamato), previamente dissolvida em 2mL de água destilada. Após a passagem de toda a solução lava-se novamente a resina até obter  $pH \geq 5$ . Por fim, para a eluição do glutamato adicionam-se 5mL de  $NH_4OH$  2M, verifica-se se o pH está acima de nove e evapora-se a solução final.

Esta solução é a que seguirá para análise por espectroscopia de RMN.

### **2.2.2.3. Isolamento da glutamina hepática**

Atendendo à dinâmica de interconversão glutamina-glutamato nos sistemas biológicos, e a fim de evitar possíveis adulterações na

quantificação do enriquecimento em  $^2\text{H}$ , um bom procedimento a adquirir será a hidrólise da glutamina a glutamato. Além disso, o glutamato, devido à sua estrutura e distribuição de cargas é mais fácil de isolar do que a glutamina, que normalmente é eluída conjuntamente com os restantes aminoácidos.

A referida hidrólise será então aplicada à solução anteriormente obtida, após a segunda lavagem da resina de troca aniónica. Esta solução será colocada dentro de um tubo de pyrex, juntamente com 2mL de HCL 6M, sendo posteriormente aquecida a  $110^\circ\text{C}$  (*Thermoblock*), durante 24h. Este procedimento levará à hidrólise ácida da glutamina, e consequente conversão a glutamato.

Decorrido o tempo de hidrólise, a solução é arrefecida e aplicada a uma coluna cromatográfica de troca catiónica. Esta coluna é preenchida com 5g de resina Dowex-50WX8-200- $\text{H}^+$ , sendo posteriormente lavada com água destilada até  $\text{pH} \geq 5$ . Após a lavagem passa-se a solução resultante da hidrólise na coluna e, no final, torna-se a lavar resina até se obter  $\text{pH} \geq 5$ . Para a eluição dos aminoácidos que ficaram retidos na coluna adicionam-se 20ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2M, e verifica-se se o pH é superior a nove. Esta solução é evaporada até a um volume final de 0-5mL, sendo depois novamente dissolvida em 2mL de água destilada e aplicada a uma coluna de troca aniónica, para se proceder ao isolamento do glutamato, proveniente da hidrólise da glutamina, dos restantes aminoácidos. Esta coluna de troca iónica é preenchida com 2g de resina Dowex-1-acetate e lavada com água destilada. Depois da resina lavada, passa-se a solução anterior na coluna adicionando-se, em seguida, 10mL de água destilada, para eluir todos os aminoácidos excepto o glutamato, que só será removido após a adição de 5mL de ácido acético. No final, esta solução é evaporada,

sendo depois novamente sujeita ao mesmo procedimento, anteriormente referido, para a remoção completa de vestígios de ácido acético. Ou seja, a solução será novamente dissolvida em 2mL de água destilada, passada numa coluna de troca catiónica, preenchida com 1g de resina Dowex-50WX8-200-H<sup>+</sup>, que será lavada com 10mL de água destilada até se obter pH $\geq$ 5, sendo no final adicionado 5mL de NH<sub>4</sub>OH 2M, com o objectivo de se remover o glutamato. Verifica-se se o pH é superior a nove e evapora-se a solução final.

Mais uma vez, será esta solução a que seguirá para análise por espectroscopia de RMN.

### **2.2.3. Análise e caracterização das amostras utilizando espectroscopia de <sup>1</sup>H e <sup>2</sup>H RMN**

Todas as amostras que seguirem para análise por espectroscopia de RMN, foram introduzidas nos respectivos tubos de RMN, juntamente com os padrões internos adequados. Estes padrões são usados para efectuar as identificações e quantificações pretendidas.

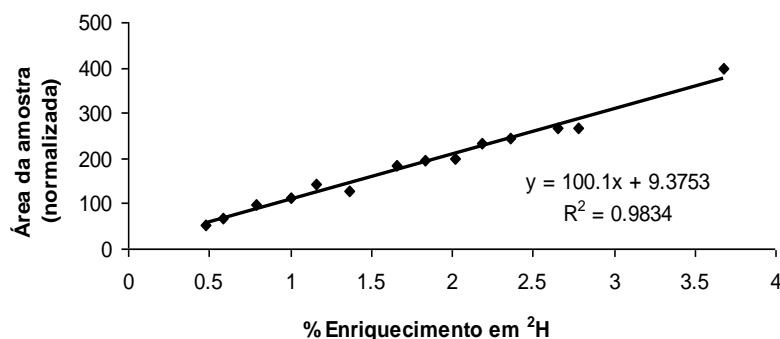
#### **2.2.3.1. Análise das BW por espectroscopia de <sup>2</sup>H RMN**

As BW (obtidas a partir do plasma, previamente centrifugado) são analisadas (em triplicado) com o objectivo de verificar a percentagem de deutério que foi incorporado pelas amostras, ou seja, o seu enriquecimento em <sup>2</sup>H. Para efectuar a análise quantitativa de cada BW, por espectroscopia de <sup>2</sup>H RMN, é utilizado, simultaneamente como solvente e como padrão interno, a acetona (desvio químico de

$\delta=2.04$  ppm relativamente ao TMS). Os valores do enriquecimento em  $^2\text{H}$ , obtidos para estas amostras, serão posteriormente utilizados na quantificação dos enriquecimentos em  $^2\text{H}$  das amostras de glutamato.

Os espectros das BW foram obtidos a 11.75 T, utilizando um espectrómetro Varian, modelo Unity-500 (Varian, Palo Alto, CA), que se encontra numa área do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), equipado com uma sonda de banda larga de 5.0 mm, e a uma temperatura de 50°C. Estes espectros foram adquiridos com desacoplamento de próton, usando um pulso ( $pw$  a 90°) de 5.8 s, um tempo de aquisição ( $at$ ) de 2.69 s, um intervalo entre pulsos ( $delay$ ) de 8.0 s, uma largura espectral ( $sw$ ) de 761 Hz e um número de transientes igual a 18 ( $nt=18$ ).

A quantificação do sinal de  $^2\text{H}$  para cada BW, foi feita usando a relação com o sinal de  $^2\text{H}$  da acetona, e simultaneamente, usando uma curva de calibração feita para este solvente (Figura 2.1), construída a partir da análise, por espectroscopia de  $^2\text{H}$  RMN, de várias soluções padrão contendo  $^2\text{H}_2\text{O}$ , com enriquecimentos em  $^2\text{H}$  conhecidos.



**Figura 2.1** – Curva de calibração da acetona usada para determinar o enriquecimento em  $^2\text{H}$  da BW, construída a partir da análise, por espectroscopia de  $^2\text{H}$  RMN de várias soluções padrão, com enriquecimentos em  $^2\text{H}$  entre 0.5-4.0%.

A regressão linear obtida indicará a relação que existe entre as áreas dos sinais  $^2\text{H}$  de cada BW, obtidos por comparação com a área do sinal  $^2\text{H}$  da acetona e com a percentagem de enriquecimento de cada solução padrão.

Todos os espectros das BW foram analisados utilizando um programa de análise espectral, o NUTSproTM (Accorn Inc., Freemont, CA).

#### **2.2.3.2. Análise do glutamato hepático por espectroscopia de $^1\text{H}$ e $^2\text{H}$ RMN**

As amostras de glutamato, anteriormente purificadas, foram dissolvidas em 200  $\mu\text{L}$  de  $^2\text{H}$  *depleted water* e em 20  $\mu\text{L}$  de DMSO 0.530% deuterado (desvio químico de  $\delta=2.56$  ppm relativamente ao TMS), utilizado como padrão interno de referência. Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^2\text{H}$  RMN foram obtidos a 14.1 T, utilizando um espectrómetro Varian, modelo Unity-600 (Varian, Palo Alto, CA), que se encontra na mesma área do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), anteriormente referida, equipado com uma sonda de banda larga de 3.0 mm e a uma temperatura de 50°C.

Para a obtenção dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN, foi utilizado um pulso (*pw* 90°) de 7.0 s, um tempo de aquisição (*at*) de 3.0 s, um intervalo entre pulsos (*delay*) de 20.0 s, uma largura espectral (*sw*) de 6010 Hz e um número de transientes igual a 1 (*nt*=1).

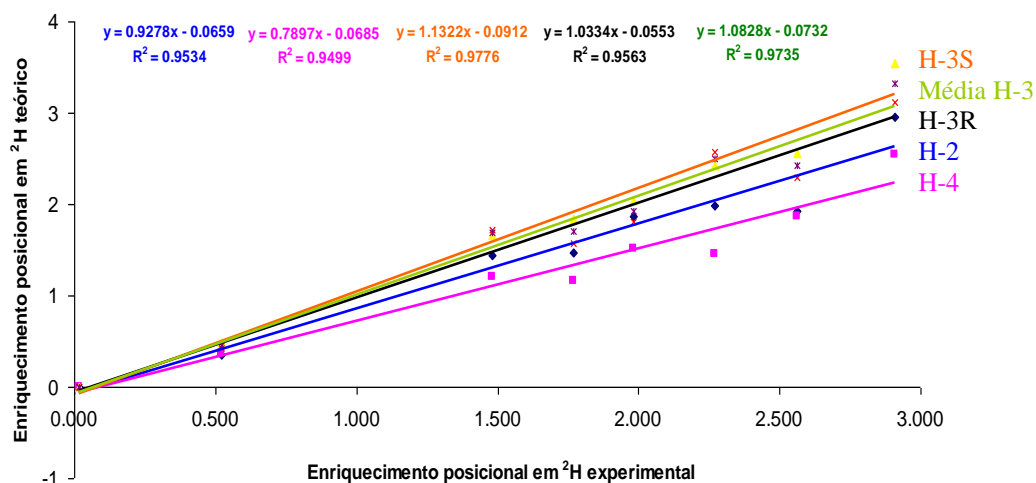
No caso dos espectros de  $^2\text{H}$  RMN, estes foram obtidos com desacoplamento de próton, usando um pulso (*pw* a 90°) de 23.5 s, um tempo de aquisição (*at*) de 2.0 s, um intervalo entre pulsos (*delay*) de

5.0 s, uma largura espectral ( $\Delta\nu$ ) de 922 Hz e um número de transientes igual a 125 ( $nt=125$ ).

Todos os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^2\text{H}$  RMN do glutamato foram analisados utilizando o programa de análise espectral NUTSproTM (Accorn Inc., Freemont, CA).

Após a obtenção dos espectros, é necessário garantir que não há diferenças significativas entre os enriquecimentos posicionais em  $^2\text{H}$ , obtidos experimentalmente e teoricamente. Para esse efeito construíram-se diferentes curvas de calibração para os diferentes hidrogénios posicionais do glutamato (Figura 2.2). Estas curvas foram feitas utilizando várias soluções padrão, com enriquecimentos em  $^2\text{H}$  entre 0.5-3.0%, feitas a partir de duas soluções de glutamina comercial, uma deuterada e outra não, que sofreram hidrólise de forma haver a conversão da glutamina a glutamato. Após a hidrólise, as soluções foram passadas numa coluna de troca catiónica, preenchida com resina Dowex-50WX8-200- $\text{H}^+$ , executando-se, em seguida, todo o procedimento já anteriormente descrito, aquando do isolamento do glutamato proveniente da hidrólise da glutamina. Estas soluções são depois analisadas por espectroscopia  $^2\text{H}$  RMN, permitindo assim a construção das referidas curvas.

As curvas de calibração permitem deduzir se existe uma boa correlação entre os valores teóricos e os experimentais obtidos para o enriquecimento em  $^2\text{H}$ , permitindo também verificar se esse enriquecimento, distribuído pelos diferentes hidrogénios posicionais da glutamina, se mantém após o processo de hidrólise e purificação, e se a técnica de RMN é um bom método para a medição correcta dos valores de enriquecimento posicional em  $^2\text{H}$ .



**Figura 2.2** – Curvas de calibração obtidas para os diferentes hidrogénios posicionais do glutamato, que correlacionam o enriquecimento posicional teórico e o enriquecimento posicional experimental, em  $^2\text{H}$ , desses mesmos hidrogénios ([2, 3, 3, 4, 4 -  $^2\text{H}$ ]).

### *Cálculo do enriquecimento posicional em $^2\text{H}$ do glutamato*

A análise dos espectros de  $^2\text{H}$  RMN do glutamato permite calcular a percentagem de enriquecimento posicional em  $^2\text{H}$ , de cada um dos seus hidrogénios (posições 2, 3 e 4). Atendendo ao valor do enriquecimento em  $^2\text{H}$  do padrão DMSO utilizado (0.530%), e considerando igual equivalência entre os diferentes hidrogénios do DMSO e do glutamato, pode obter-se o valor do enriquecimento de qualquer um dos hidrogénios do glutamato, efectuando simplesmente a multiplicação do enriquecimento em  $^2\text{H}$  do DMSO, pela razão entre as intensidades dos sinais de  $^2\text{H}$  do DMSO e do glutamato. Contudo, como nem todas as amostras apresentam iguais quantidades de DMSO e de glutamato, tem que se considerar, adicionalmente, as suas

quantidades relativas. Estas quantidades são obtidas a partir da razão entre as intensidades dos sinais de  $^1\text{H}$  do DMSO e do glutamato. Ou seja, para o hidrogénio na posição 2, o enriquecimento em  $^2\text{H}$  é obtido através da seguinte equação:

$$\% \text{ enriquecimento } ^2\text{H}_{\text{H-2}} = 0.530\% \times (A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{H-2}}} / A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{DMSO}}}) \times (A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{DMSO}}} / A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{H-2}}}) \quad (1)$$

No caso do enriquecimento em  $^2\text{H}$  do hidrogénio presente na posição 4, este é obtido de forma um pouco diferente. Como nesta posição existem dois hidrogénios magneticamente equivalentes, o sinal  $^2\text{H}$  obtido representará a soma do enriquecimento dos dois hidrogénios e não o valor pretendido para apenas um hidrogénio. Assim sendo, para efectuar o cálculo do enriquecimento pretendido, considera-se a média dos enriquecimentos destes dois hidrogénios, obtida através da multiplicação do sinal total por 0.5, ou seja:

$$\% \text{ enriquecimento } ^2\text{H}_{\text{H-4}} = 0.530\% \times 0.5 \times (A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{H-4}}} / A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{DMSO}}}) \times (A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{DMSO}}} / A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{H-4}}}) \quad (2)$$

A quantificação do enriquecimento em  $^2\text{H}$  dos hidrogénios presentes na posição 3 (H-3S e H-3R), em condições normais, seria efectuada exactamente da mesma forma que a aplicada para o hidrogénio H-2 e utilizando a eq. (1). Esta quantificação permite simplificar o cálculo, dado que o H-2 apresenta um sinal simples no espectro de  $^1\text{H}$  RMN, teoricamente equivalente em intensidade a cada um dos sinais pertencentes aos hidrogénios na posição 3, em vez do



multiplete complexo (devido acoplamento de spin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) apresentado no espectro de  $^1\text{H}$  RMN pelos hidrogénios na posição 3.

Contudo, no presente trabalho nem sempre foi possível quantificar o sinal de  $^1\text{H}$  pertencente ao hidrogénio da posição 2, como será discutido mais à frente, levando a que quantificação do enriquecimento em  $^2\text{H}$ , para os hidrogénios da posição 3, tenha sido efectuada tendo como base o sinal referente ao hidrogénio da posição 4, ou seja:

$$\% \text{ enriquecimento } ^2\text{H}_{\text{H-3S}} = 0.530\% \times (A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{H-3S}}} / A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{DMSO}}}) \times (A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{DMSO}}} / A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{H-4}}}) \quad (3)$$

$$\% \text{ enriquecimento } ^2\text{H}_{\text{H-3R}} = 0.530\% \times (A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{H-3R}}} / A_{\text{sinal } ^2\text{H}_{\text{DMSO}}}) \times (A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{DMSO}}} / A_{\text{sinal } ^1\text{H}_{\text{H-4}}}) \quad (4)$$

### *Cálculo dos parâmetros metabólicos de fluxo*

Os parâmetros metabólicos de fluxo da glutamina hepática são estimados a partir dos valores de enriquecimento em  $^2\text{H}$  do glutamato e das BW. Estes parâmetros são calculados considerando a relação existente entre as contribuições de glutamina feitas a partir de uma fonte metabólica (ciclo de Krebs) e as contribuições feitas a partir de uma fonte proteolítica. Ou seja, a fracção de glutamina hepática, que provém de uma fonte metabólica é calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ Metabólica} = 100 \times (\text{Enriquecimento médio em } ^2\text{H do sinal H-3/BW}) \quad (5)$$

E a fracção de glutamina hepática que provém de uma fonte proteolítica é calculada através da equação:

$$\% \text{ Proteolítica} = 100 - \% \text{ Metabólica} \quad (6)$$

### 2.2.3.3. Análise da glutamina hepática por espectroscopia de $^1\text{H}$ RMN

As amostras de glutamina, anteriormente convertida por hidrólise ácida a glutamato, foram dissolvidas em ~500  $\mu\text{L}$  de  $^2\text{H}_2\text{O}$  e em 25  $\mu\text{L}$  de formato de potássio, que apresenta um único sinal singuleto para um desvio químico  $\delta=8.48$  ppm relativamente ao TMS.

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN foram obtidos a 11.75 T, utilizando um espectrómetro Varian, modelo Unity-500 (Varian, Palo Alto, CA), equipado com uma sonda de banda larga de 5.0 mm e a uma temperatura de 25°C. Para a obtenção dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN, foi utilizado um pulso ( $pw$  90°) de 10.0 s, um tempo de aquisição ( $at$ ) de 2.56 s, um intervalo entre pulsos ( $delay$ ) de 45.0 s, uma largura espectral ( $sw$ ) de 4993 Hz e um número de transientes igual a 16 ( $nt=16$ ).

Tal como para todos os outros espectros, anteriormente obtidos, também os espectros de  $^1\text{H}$  RMN da glutamina foram analisados utilizando o programa de análise espectral NUTSproTM (Accorn Inc., Freemont, CA).

A análise desta glutamina hepática, convertida a glutamato por hidrólise ácida, não exigiu nenhum tipo de cálculos, quer do enriquecimento posicional em  $^2\text{H}$ , quer dos parâmetros metabólicos de

fluxo, dado que a sua quantificação por  $^1\text{H}$  RMN não foi possível, como será posteriormente discutido.

## **Capítulo 3 – *Resultados e Discussão***

### 3. Resultados e Discussão

A realização do presente estudo permitiu a obtenção de alguns resultados, que servirão como informação complementar a um vasto estudo, que pretende entender e analisar o modo como determinadas alterações, que ocorrem ao nível do metabolismo, poderão estar relacionadas, ou não, com o aparecimento da caquéxia cardíaca.

#### 3.1. Análise do enriquecimento em $^2\text{H}$ das BW

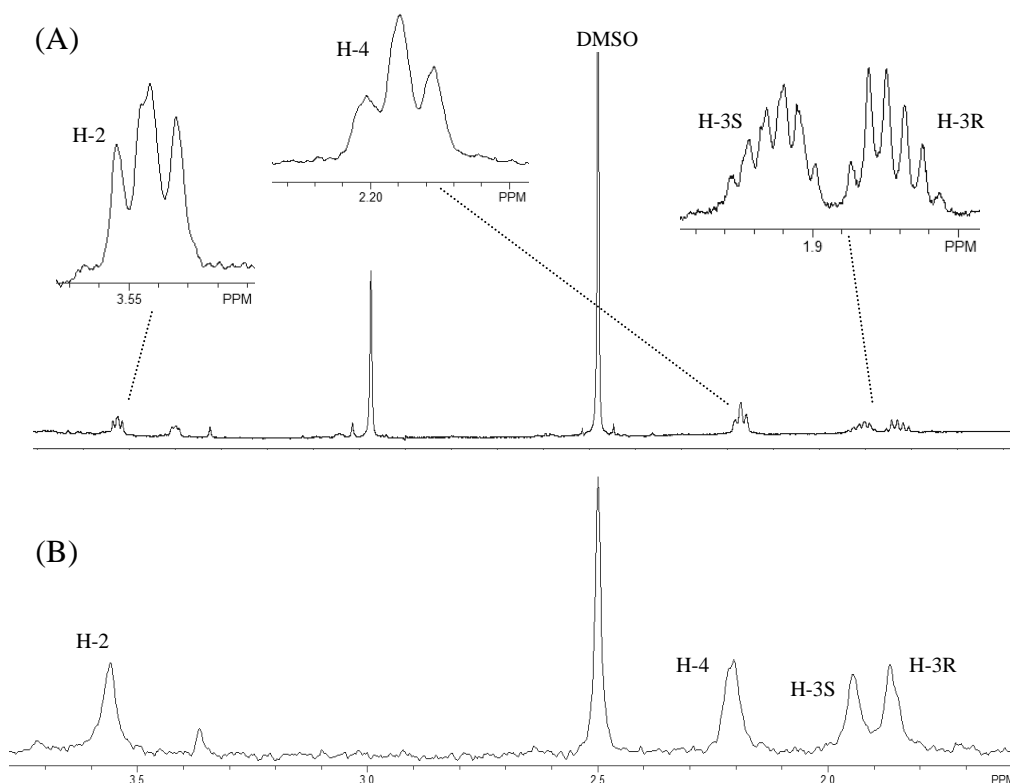
Os valores dos enriquecimentos em  $^2\text{H}$  das BW foram obtidos por espectroscopia de  $^2\text{H}$  RMN, e encontram-se sumariados na Tabela 3.1. A quantificação do sinal de  $^2\text{H}$  de cada BW é feita através da relação com o sinal de  $^2\text{H}$  da acetona, tendo como base a sua curva de calibração, tal como referido anteriormente. Todas as BW apresentam um enriquecimento em  $^2\text{H}$  de cerca de 3% (Tabela 3.1), o que permite deduzir que o procedimento efectuado no tratamento dos animais foi bastante eficaz, uma vez que o enriquecimento em  $^2\text{H}$  pretendido era de 3%. Contudo, embora a diferença não seja muito significativa, verifica-se que o enriquecimento das BW dos animais de controlo é ligeiramente maior do que o das BW pertencentes aos animais tratados com MCT. Estes resultados servirão de apoio na análise do enriquecimento posicional dos hidrogénios do glutamato hepático.

#### 3.2. Análise do enriquecimento posicional em $^2\text{H}$ do glutamato hepático

Após todo o procedimento de isolamento e purificação do glutamato, é possível analisar o enriquecimento posicional em  $^2\text{H}$  dos

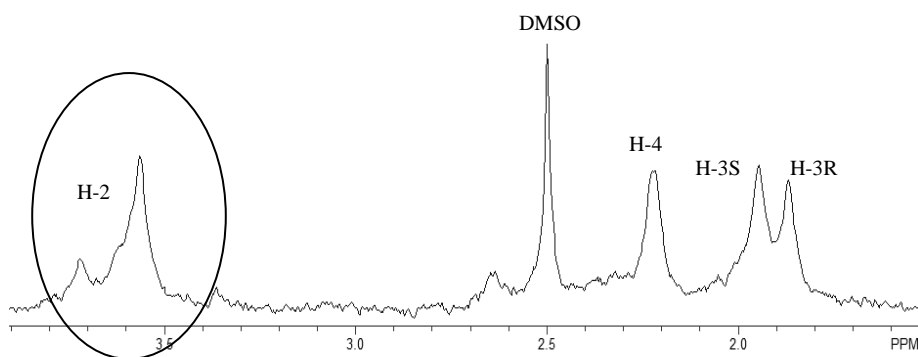
hidrogénios deste composto, por espectroscopia de  $^1\text{H}$  e  $^2\text{H}$  RMN. A utilização desta técnica permite a obtenção de espectros de  $^1\text{H}$  e  $^2\text{H}$  RMN, para cada amostra, onde se poderá identificar todos os sinais pertencentes aos hidrogénios posicionais do glutamato, bem como o sinal do padrão interno, o DMSO. A Figura 3.1 apresenta um espectro de  $^1\text{H}$  RMN (A) e um espectro de  $^2\text{H}$  RMN (B), obtidos a partir da análise do glutamato hepático presente numa das amostras de fígado utilizadas.

Analisando os espectros verifica-se que os sinais do glutamato se encontram na região entre 1.5-4.0 ppm, aparecendo um sinal desconhecido a ~3.0 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  RMN.



**Figura 3.1** – Espectros de  $^1\text{H}$  (A) e  $^2\text{H}$  RMN (B) obtidos para o glutamato hepático, presente numa amostra de fígado de rato.

Os espectros obtidos para cada uma das amostras de glutamato hepático, e a boa resolução do sinal do padrão DMSO, permitiram fazer a quantificação do enriquecimento posicional dos hidrogénios do glutamato, presente em cada amostra. Contudo, no presente trabalho, a quantificação do enriquecimento posicional em  $^2\text{H}$  só foi possível para os hidrogénios das posições 3 e 4, dado que o hidrogénio da posição 2, na maioria dos espectros de  $^2\text{H}$  RMN, obtidos para as diferentes amostras, apresentava uma sobreposição de um outro sinal (Figura 3.2). Esta sobreposição conduziria a erros significativos na quantificação, sendo a melhor opção, de forma a uniformizar os cálculos, desprezar este sinal.



**Figura 3.2** – Espectro de  $^2\text{H}$  RMN obtido para o glutamato hepático, presente numa amostra de fígado de rato, evidenciando uma sobreposição do sinal do hidrogénio da posição 2.

A quantificação do enriquecimento em  $^2\text{H}$  dos hidrogénios das posições 3 e 4 é feita com base na relação entre a intensidade de cada um dos sinais pertencentes aos diferentes hidrogénios e a intensidade do sinal do padrão, e utilizando as eqs. (2)-(4) do capítulo 2. Para efectuar a referida quantificação são utilizadas directamente as razões

dos sinais referentes aos hidrogénios das diferentes posições, e não os enriquecimentos obtidos pelas curvas de calibração, anteriormente apresentadas.

Atendendo aos limites de incerteza considerados, verifica-se que o declive e a intercepção obtidos para os sinais H-2 e H-3, através das suas curvas de calibração, são muito semelhantes com o da linha de identificação (H-2:  $y=0.9278x-0.0659$  e  $R^2=0.9534$ ; H-3S:  $y=1.1322x-0.0912$  e  $R^2=0.9776$ ; H-3R:  $y=1.0334x-0.0553$  e  $R^2=0.9563$ ), levando a que as razões destes sinais possam, então, ser directamente utilizadas. No caso do sinal H-4, que representa o enriquecimento de dois hidrogénios magneticamente equivalentes, verifica-se que o declive obtido através da sua curva de calibração é um pouco mais baixo do que a identidade ( $\sim 0.8$ ; H-4:  $y=0.7897x-0.0685$  e  $R^2=0.9499$ ). Inicialmente, pensou-se que este facto seria o reflexo de uma menor quantidade de  $^2\text{H}$  na posição 4, comparativamente com as outras posições do padrão de  $^2\text{H}$ -glutamato a 99%, contudo alguns estudos de  $^1\text{H}$  RMN indicaram que todas as posições do glutamato foram igualmente enriquecidas com  $^2\text{H}$  (ou seja, o sinal obtido no espectro de  $^1\text{H}$  RMN, não foi mais elevado para o hidrogénio da posição 4 comparativamente com os das outras posições). Então, o que se estabelece como hipótese, é que o facto do padrão  $^2\text{H}$ -glutamato a 99% ser enriquecido em  $^2\text{H}$  em ambos os hidrogénios da posição 4, leva a que este sinal gere um conjunto de sinais satélite em torno da ressonância do singuleto principal, devido ao acoplamento  $^2\text{H}$ - $^2\text{H}$  entre os sinais H-4. Estes satélites embora sejam muito difíceis de visualizar, dado que se confundem com o ruído, poderão explicar a diferença apresentada pelo sinal total do H-4 ( $\sim 15\text{-}20\%$  do sinal total), uma vez que ao efectuar-se o ajuste da curva, estes satélites não serão incluídos,



levando a que este sinal seja menor do que o esperado. No caso das amostras reais, apenas um dos hidrogénios da posição 4, de cada molécula de glutamato, está marcada, levando a que não ocorra o acoplamento  $^2\text{H}$ - $^2\text{H}$ , e consequentemente, o sinal H-4 seja inteiramente representado por um singuleto, podendo ser directamente comparado com os restantes sinais.

Todos os resultados obtidos para a quantificação do enriquecimento em  $^2\text{H}$  dos hidrogénios das posições 3 e 4 do glutamato encontram-se registados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** – Valores dos enriquecimentos em  $^2\text{H}$  obtidos para os hidrogénios do glutamato hepático, das posições 3 e 4, e para a BW, presentes em amostras de fígado de rato, e respectivo valor da razão entre os enriquecimentos posicionais desses hidrogénios.

		Enriquecimentos em $^2\text{H}$ (%)				
	Designação da amostra	Hidrogénio 3S	Hidrogénio 3R	Hidrogénio 4	Razão H-4/H-3	BW
Animais de Controlo	L2	2.91	2.91	1.83	0.63	3.00
	L4	2.72	2.72	2.15	0.79	3.16
	L5	2.62	2.62	1.83	0.7	3.03
	L9	3.06	3.06	1.64	0.54	3.14
	L11	3.05	3.05	1.81	0.59	3.35
	L12	2.78	2.78	1.71	0.62	2.78
	Média ± SEM*	2.86 ± 0.07	2.86 ± 0.07	1.83 ± 0.07	0.65 ± 0.04	3.08 ± 0.08
Animais Doentes (MCT)	L1	2.21	2.21	1.47	0.67	2.98
	L3	2.01	2.01	1.32	0.66	3.18
	L6	1.58	1.58	1.05	0.66	2.13
	L7	2.58	2.58	1.80	0.70	3.28
	L8	2.18	2.18	1.35	0.62	3.07
	L10	2.19	2.19	1.37	0.63	2.69
	Média ± SEM*	2.13 ± 0.13	2.13 ± 0.13	1.39 ± 0.10	0.66 ± 0.01	2.89 ± 0.17
Valor de p		0.0007	0.0007	0.005	0.76	0.34

\* erro padrão da média ("standard error of mean")

Analisando a Tabela 3.1 verifica-se que os hidrogénios da posição 3 apresentam maiores valores de enriquecimento, comparativamente com os obtidos para os hidrogénios da posição 4, tanto para os animais de controlo ( $2.86 \pm 0.07\%$  vs  $1.83 \pm 0.07\%$ ), como para os animais tratados com MCT ( $2.13 \pm 0.13\%$  vs  $1.39 \pm 0.10\%$ ).

O enriquecimento dos hidrogénios da posição 3, atendendo à Figura 1.9, só é possível se o esqueleto carbonado do glutamato provir do citrato, que poderá ter várias fontes, nomeadamente, o ciclo de Krebs <sup>[15]</sup>. O hidrogénio 3*R* é incorporado durante a conversão do citrato a isocitrato, catalisada pela aconitase. No caso do hidrogénio 3*S*, este é incorporado durante a conversão do isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato, após a adição de prótons ao intermediário transitório oxalosucinato. Durante uma única “volta” do ciclo de Krebs, estes dois hidrogénios ficam equivalentemente enriquecidos, pelo contacto com a BW enriquecida, levando a que o enriquecimento do glutamato na posição 3 seja equivalente à fracção de glutamina que deriva do ciclo de Krebs, e que reflecta o enriquecimento da BW.

Analisando novamente a Tabela 3.1, verifica-se que no caso dos animais de controlo, os valores de enriquecimento obtidos experimentalmente para os hidrogénios da posição 3 se encontram próximos dos valores de enriquecimento obtidos para as BW ( $2.86 \pm 0.07\%$  vs  $3.08 \pm 0.08\%$ ), contrariamente ao que acontece no caso dos animais tratados com MCT ( $2.13 \pm 0.13\%$  vs  $2.89 \pm 0.17\%$ ), onde estes valores são relativamente diferentes. Este facto demonstra que, embora em ambos os casos, os hidrogénios da posição 3 se encontrem em completo equilíbrio com a BW, no caso dos animais tratados com MCT, existirá uma alta contribuição proteolítica de glutamato hepático

não marcado. Esta contribuição, resultante da quebra acelerada das proteínas (característica de um estado de caquéxia), irá resultar na diluição do enriquecimento e, conseqüentemente, na diferença apresentada pelos dois grupos de animais, como veremos mais à frente.

No caso do enriquecimento da posição 4, verifica-se que este se encontra abaixo dos valores de enriquecimento calculados para as BW, quer para o grupo dos animais de controlo, quer para o grupo dos animais tratados com MCT.

O carbono 4 do glutamato e o seu par de hidrogénios, magneticamente equivalentes, provêm, respectivamente, do carbono metílico e dos hidrogénios metílicos da acetil CoA, que é um produto comum da oxidação do piruvato e dos ácidos gordos. Assim sendo, o enriquecimento dos hidrogénios da posição 4, irá reflectir o enriquecimento das moléculas de acetil CoA que entram no ciclo de Krebs, através do enriquecimento dos seus precursores (*e.g.* piruvato). A extensão deste enriquecimento, atendendo a que o enriquecimento dos hidrogénios na posição 4 reflecte o enriquecimento dos hidrogénios metílicos da acetil CoA e que os hidrogénios da posição 3 se encontram em completo equilíbrio com a BW, pode ser determinada através da razão entre os enriquecimentos relativos dos hidrogénios da posição 4 com os da posição 3 (H4/H3). Desta forma será simultaneamente determinado o enriquecimento real da acetil CoA, que é também muito importante dado que esta coenzima tem um papel central em vários metabolismos <sup>[15]</sup>.

O valor obtido para a razão H4/H3 para os animais de controlo foi  $0.65 \pm 0.04\%$  e para os animais tratados com MCT foi  $0.66 \pm 0.01\%$  (Tabela 3.1), o que significa que, para ambos os grupos, por cada molécula de glutamato marcado na posição 4, existem

aproximadamente duas moléculas de glutamato marcado na posição 3. Além disso este valor é também muito importante para confirmar a percentagem de enriquecimento da acetil CoA que está realmente em equilíbrio com a BW (cerca de 65% em cada grupo).

A diferença apresentada entre os enriquecimentos dos hidrogénios das diferentes posições e os enriquecimentos das BW poderá ser explicado pela ocorrência de uma compartimentação do glutamato. Ou seja, se uma parte considerável do volume (*pool*) de glutamato hepático ficar compartimentada, este não se encontrará disponível para efectuar trocas entre os hidrogénios da  $^2\text{H}_2\text{O}$  (presente na BW), levando a que se verifiquem valores de enriquecimento mais baixos, como é o caso dos hidrogénios da posição 4.

Analizados os valores obtidos para o enriquecimento posicional dos vários hidrogénios do glutamato hepático, pode então prosseguir-se para a etapa seguinte deste trabalho. Ou seja, utilizando estes resultados, irão determinar-se os parâmetros de fluxo da glutamina hepática, que permitirão estabelecer uma relação entre as diferentes contribuições de glutamina/glutamato e o possível aparecimento da caquécia cardíaca nos animais em estudo.

Atendendo a que extensão do volume (“*pool*”) do glutamato hepático está relacionada com todas as fontes e com todos os fluxos de glutamato que existem no organismo, é de extrema importância o estudo do seu enriquecimento, através da administração da  $^2\text{H}_2\text{O}$ , uma vez que este apresenta alta sensibilidade a alterações sistémicas no metabolismo da glutamina/glutamato hepáticos. A sensibilidade a todas estas alterações poderá servir como uma espécie de diagnóstico a determinadas doenças metabólicas, nomeadamente a caquécia cardíaca. Esta doença, tal como foi anteriormente referido, é uma doença

caracterizada por elevada perda de massa muscular, e atendendo a que o glutamato é um aminoácido com presença abundante no músculo, o estudo do seu enriquecimento levará a que se obtenham bons resultados na identificação de alterações metabólicas associadas à caquécia cardíaca.

A análise do enriquecimento posicional do glutamato, para as várias amostras, permite esclarecer de que forma as diferentes contribuições, metabólicas ou proteolíticas, influenciam o enriquecimento da glutamina hepática, de acordo com o grupo a que cada uma destas amostras pertence, ou seja, ao grupo dos animais tratados com MCT (doentes) ou ao grupo dos animais tratados com a solução salina (controlo). Para isso são calculados os parâmetros metabólicos de fluxo da glutamina hepática, através das eqs. (5) e (6) do capítulo 2, considerando os valores obtidos para o enriquecimento posicional do glutamato e para as BW.

Na Tabela 3.2 estão registados os resultados obtidos para os parâmetros metabólicos de fluxo.

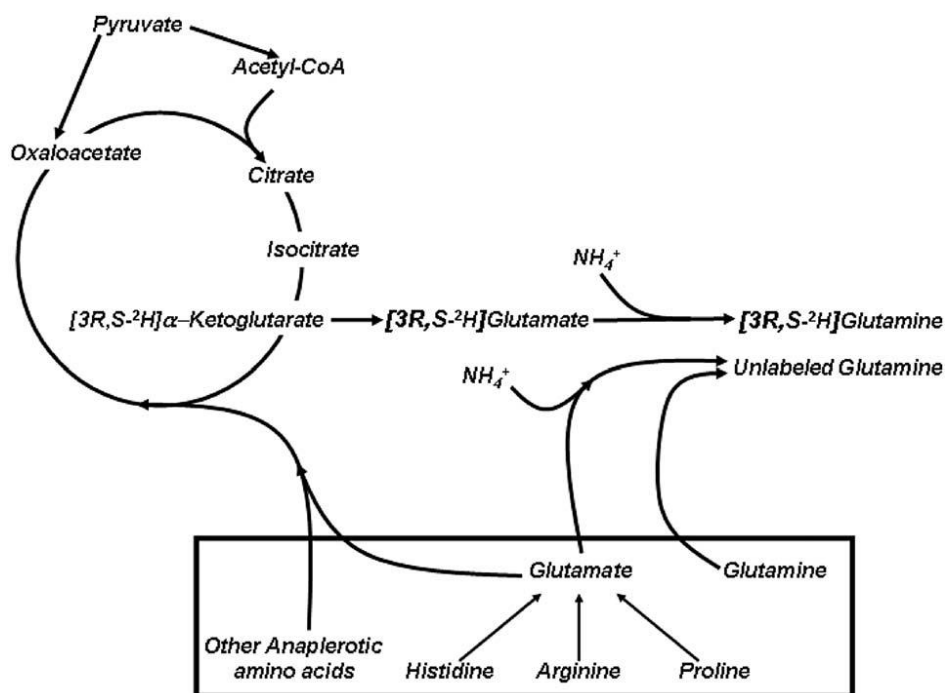
**Tabela 3.2** - Valores obtidos para os parâmetros metabólicos de fluxo da glutamina hepática, obtidos a partir dos valores de enriquecimento em  $^2\text{H}$  do glutamato, tendo em conta a razão entre a média do enriquecimento dos hidrogénios da posição 3 e as BW.

	Designação da amostra	H-3/BW	Fonte Metabólica (%)	Fonte Proteolítica (%)
Animais de Controlo	L2	0.97	97	3
	L4	0.86	86	14
	L5	0.86	86	14
	L9	0.97	97	3
	L11	0.91	91	9
	L12	1.00	100	0
	Média ± SEM*	0.93 ± 0.02	93 ± 2	7 ± 2
Animais Doentes (MCT)	L1	0.74	74	26
	L3	0.63	63	37
	L6	0.74	74	26
	L7	0.79	79	21
	L8	0.71	71	29
	L10	0.80	80	20
	Média ± SEM*	0.74 ± 0.03	74 ± 3	27 ± 3
Valor de p		0.0003	0.0003	0.0003

\* erro padrão da média ("standard error of mean")

A explicação plausível, estabelecida como hipótese, para esclarecer a separação efectuada dos diferentes grupos, está relacionada, tal como foi previamente referido, com o facto do enriquecimento em  $^2\text{H}$  do glutamato hepático obtido a partir da  $^2\text{H}_2\text{O}$  (glutamato marcado), proveniente de uma fonte metabólica (ciclo de

Krebs), ser diluído pelo glutamato/glutamina não marcado, proveniente de uma fonte proteolítica (Figura 3.3).



**Figura 3.3** – Esquema representativo das principais fontes (metabólica - ciclo de Krebs e proteolítica) de glutamina/glutamato marcados e não marcados, adaptado da Ref. <sup>[15]</sup>.

Ou seja, se o tratamento com a MCT, com o passar do tempo, resultar no desenvolvimento de caquécia cardíaca, por parte dos animais, isto leva a que se verifique um aumento na taxa de aparecimento de glutamina/glutamato proteolítica, resultante do hipercatabolismo proteico característico da doença, o que terá como consequência directa a diluição do enriquecimento em  $^2\text{H}$  do glutamato hepático, comparativamente com o da BW e com o apresentado pelos

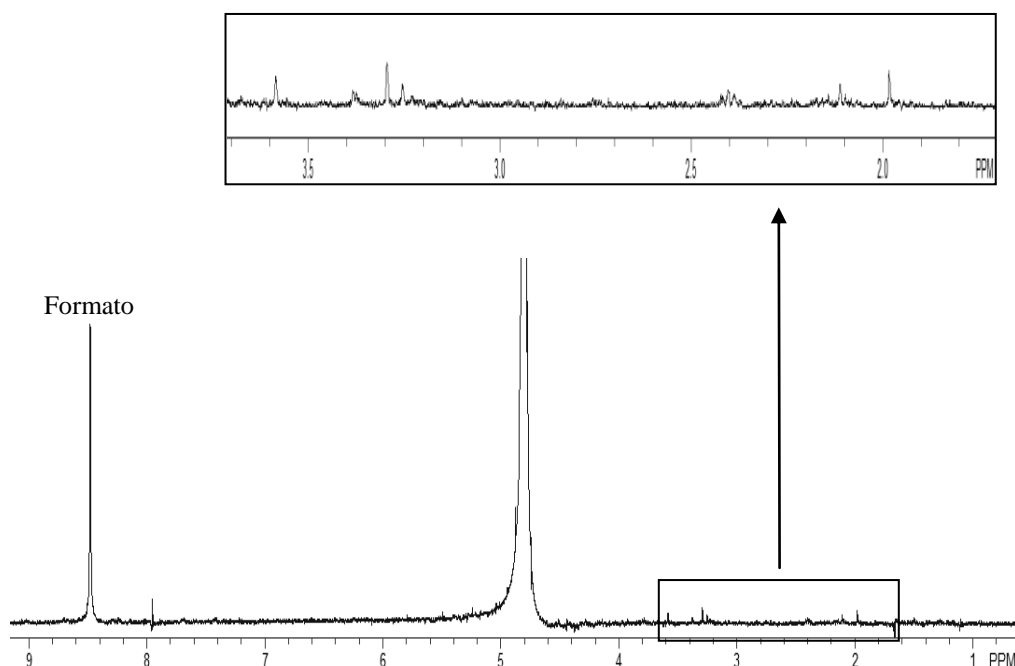
animais de controlo. Assim sendo, o que se espera é que a fracção de glutamina hepática que provém de uma fonte proteolítica seja maior para os animais doentes do que para os animais de controlo. E, se se usar como critério de separação, animais tratados com MCT vs animais não tratados com MCT, o que se observa, analisando a Tabela 3.2, é que existe um grupo de seis animais com baixa contribuição proteolítica de glutamato hepático (0-14%), com enriquecimentos entre 80% a 100% da BW (animais de controlo); e um outro grupo de seis animais que apresentam alta contribuição proteolítica para a “pool” de glutamina hepática (20-37%), com enriquecimentos entre 65% a 80% da BW (animais doentes -tratados com MCT).

O facto de todos os resultados obtidos no presente estudo, embora ainda numa fase inicial, tornarem possível efectuar uma separação entre os animais doentes (com caquécia cardíaca) e os animais de controlo, leva a que se surjam novas expectativas acerca da possível determinação de um diagnóstico precoce para a caquécia cardíaca.

### **3.3. Análise do enriquecimento posicional em $^2\text{H}$ da glutamina hepática**

Após a conversão da glutamina hepática a glutamato, por hidrólise ácida, e após o isolamento e purificação deste glutamato, é possível analisar este composto por espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN. A Figura 3.4 apresenta um espectro de  $^1\text{H}$  RMN, obtido a partir da análise do glutamato, proveniente da hidrólise ácida da glutamina hepática, presente numa das amostras de fígado utilizadas.





**Figura 3.4** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN obtido para o glutamato, proveniente da hidrólise ácida da glutamina hepática, presente numa amostra de fígado de rato.

Após a análise do espectro verifica-se que a região característica do glutamato (1.5-4.0 ppm), embora apresente alguns sinais, estes são muito pequenos e inconclusivos, dado que a sua pequena intensidade não permite que estes sejam quantificáveis. Além disso, os sinais apresentados no espectro encontram-se desviados da posição em que normalmente aparecem os sinais referentes aos hidrogénios posicionais do glutamato, levando a que haja incerteza na atribuição dos respectivos sinais. Por tudo isto, e devido à impossibilidade de se efectuarem as respectivas quantificações, não faria sentido recorrer à análise de um espectro de  $^2\text{H}$  RMN, nem realizar os cálculos, previamente efectuados para o glutamato hepático.

Ou seja, atendendo a tudo o que foi referido, o que se verifica, após a análise de todos os espectros de  $^1\text{H}$  RMN obtidos para as amostras em causa, é que no caso de animais alimentados (condições utilizadas no presente estudo) o tecido hepático destes apresenta mais glutamato do que glutamina.

## **Capítulo 4 – *Conclusão***

## 4. Conclusão

No presente trabalho foi estudado um modelo animal, que demonstrou ser um bom modelo para o estudo do perfil metabólico da caquécia cardíaca.

Utilizando a  $^2\text{H}_2\text{O}$  como marcador, torna-se possível “acompanhar” as marcações posicionais dos respectivos hidrogénios do glutamato hepático, ao longo das vias metabólicas em que este participa. A utilização da MCT tornou possível a indução de determinadas doenças nos animais, levando a que se conseguisse simular as condições de estudo pretendidas.

A realização de todo o trabalho experimental, nomeadamente, a realização de todo o processo de extracção e isolamento da glutamina/glutamato hepáticos, tornou possível demonstrar que o enriquecimento em  $^2\text{H}$  dos hidrogénios posicionais do glutamato hepático, obtido a partir do enriquecimento da BW, pode ser analisado através de espectroscopia de  $^1\text{H}$  e de  $^2\text{H}$  RMN. Além disso, os espectros de  $^2\text{H}$  RMN obtidos para as amostras de glutamato permitiram estimar o enriquecimento em  $^2\text{H}$  dos hidrogénios da posição 3 (3S e 3R), onde se verifica que estes se encontram em perfeito equilíbrio com a BW, e o enriquecimento em  $^2\text{H}$  dos hidrogénios da posição 4, onde se verifica que estes derivam dos hidrogénios metílicos da acetil CoA. Estes espectros permitiram também estimar a extensão do enriquecimento em  $^2\text{H}$  do grupo metílico da acetil-CoA, feito através da razão entre os enriquecimentos dos hidrogénios da posição 4 e os da posição 3.

Com este trabalho, verifica-se ainda, que a análise deste enriquecimento posicional permite esclarecer de que forma as diferentes contribuições, metabólicas ou proteolíticas, influenciam o enriquecimento da glutamina hepática, de acordo com o grupo a que

cada uma destas amostras pertence, ou seja, ao grupo dos animais tratados com MCT (doentes) ou ao grupo dos animais tratados com a solução salina (controlo), concluindo-se, após a análise dos resultados, que uma maior contribuição proteolítica está relacionada com o aparecimento da doença, e consequentemente uma menor contribuição proteolítica (maior contribuição metabólica) está relacionada com os casos normais. Este resultado é determinante, levando a que se tenham boas expectativas relativamente à compreensão da caquécia cardíaca e à possível definição do perfil metabólico desta doença. A definição deste perfil metabólico tornará possível a determinação de um diagnóstico precoce, e consequentemente o combate atempado desta doença.

No caso da análise da glutamina hepática, ou seja, a análise do glutamato proveniente da hidrólise ácida da glutamina hepática, a espectroscopia de  $^1\text{H}$  e de  $^2\text{H}$  RMN não demonstrou ser muito eficaz, contudo há que considerar a reduzida quantidade de amostra que se utilizou em todo este estudo (~1g). Existem fortes possibilidades de que um aumento na quantidade de amostra, assim como num aumento no número de amostras, levará à obtenção de melhores resultados, no futuro. Ainda assim, após a análise espectral das amostras de glutamina hepática, pode concluir-se que no caso estudado, ou seja, no caso de animais alimentados, existe mais glutamato que glutamina.

Em termos globais, pode afirmar-se que o modelo animal utilizado foi essencial para a elaboração do presente estudo, constituindo uma excelente base de trabalho.

## Trabalho futuro

Num futuro próximo pretende-se que todo o procedimento experimental, utilizado neste trabalho, seja aplicado a amostras com maiores quantidades e a um maior número destas, a fim de se obter uma maior variabilidade de resultados, que levarão a conclusões mais precisas. Além disso pretende-se aplicar este estudo a animais não alimentados, dado que existem fortes indícios de que os resultados finais sejam diferentes, e simultaneamente, pretende-se usar uma nova técnica, a cromatografia líquida de ultra pressão acoplada a espectrometria de massa (UPLC-MS), que permitirá efectuar quantificações de enriquecimentos com uma maior sensibilidade, possibilitando desta forma a análise da glutamina/glutamato plasmáticos.

Por fim, uma boa sugestão e uma pretensão é que este estudo se estenda a humanos (com maior massa corporal que os ratos), utilizando para o efeito um método simples e não invasivo, como por exemplo o uso de amostras de urina, tal como descrito no estudo de *Barosa, C. et al* (2009).

## **Capítulo 5 – *Referências bibliográficas***

## 5. Referências Bibliográficas

- [1] Lainscak, M. et al.; “*Cachexia: Common, Deadly, With an Urgent Need for Precise Definition and New Therapies*”; American Journal of Cardiology; 101; 1-3; 2008
- [2] Clarck, A.; Anker, S.; “*Body mass, chronic heart failure, surgery and survival*”; Journal of Heart and Lung Transplantation; 29; 261-4; 2010
- [3] Voet D.; Voet, J. G.; “*Bioquímica*” (3ª edição); Artmed Editora S.A.; 2006
- [4] Gilbert, H.; “*Basic Concepts in Biochemistry*” (2ª edição); McGraw-Hill Companies, Inc.; 2000
- [5] Stryer, L.; “*Bioquímica*” (4ª edição); Guanabara Koogan; 1996
- [6] Zubay, G.; “*Biochemistry*” (4ª edição); Wm. C. Brown Publishers; 1998
- [7] Nelson, D., Cox, M.; “*Lenhinger, Principles of Biochemistry*” (3ª edição); Worth Publishers; 2000
- [8] [www.ufp.pt](http://www.ufp.pt)
- [9] Campos, L. S.; “*Entender a Bioquímica*” (4ª edição); Escolar Editora; 2005
- [10] Canioni, P.; Quistorff, B.; “*Liver physiology and metabolism*”; NMR Physiol. Biomed.; 20; 373-388; 1994



- [11] Furst, P.; “*Basics in clinical nutrition: Proteins and amino acids*”; European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism; 1; 1-5; 2008
- [12] Dioguardi, F.; “*Wasting and the Substrate-to-Energy Controlled Pathway: A Role for Insulin Resistance and Amino Acids*”; 93(suppl); 6A-12A; 2004
- [13] Pasini, E.; Aquilani, R.; Dioguardi, F.; “*Amino Acids: Chemistry and Metabolism in Normal and Hypercatabolic States*”; 93 (suppl); 3A-5A; 2004
- [14] Tapiero, H.; Mathé, G.; Couvreur, P.; Tew, K.; “*Glutamine and glutamate*”; Biomedecine & Pharmacotherapy; 56; 446-457; 2002
- [15] Barosa, C.; Almeida, M.; Caldeira, M. M.; Gomes, F.; Jones, J.; “*Contribution of proteolytic and metabolic sources to hepatic glutamine by  $^2\text{H}$  NMR analysis of urinary phenylacetylglutamine  $^2\text{H}$ -enrichment from  $^2\text{H}_2\text{O}$* ”; Metabolic Engineering; (in press)
- [16] Francisco, T.; Pithon-Curi, T.; Curi, R.; Júnior, J.; “*Glutamina: metabolismo, destinos, funções e relação com o exercício físico*”; Arq. Ciênc. Saúde Unipar; 6; 81-88; 2002
- [17] Newsholme, P.; Procopio, J.; Lima, M.; Pithon-Curi, T.; “*Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function*”; Cell Biochem. Funct.; 21; 1-9; 2003
- [18] Watford, M.; “*Glutamine and Glutamate Metabolism across the liver sinusoid*”; Journal of Nutrition; 130; 983-987; 2000

- [19] Mouchard, M.; Bes, S.; Mignon, M.; Meynial-Denis, D.; “*Fasting up-regulates muscle glutamine synthetase in male rats during aging*”; European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism; 3; 309-315; 2008
- [20] Vánky, F.; Hakanson, E.; Jorfeldt, L.; Svedjeholm, R.; “*Does glutamate influence myocardial and pheripheral tissue metabolism after aortic valve replacement for aortic stenosis?*”; Clinical Nutrition; 25; 913-922; 2006
- [21] Chambon-Savanovitch, C. et al.; “*Can a glutamate-enriched diet counteract glutamine depletion in endotoxemic rats?*”; J. Nutr. Biochem.; 10; 331-337; 1999
- [22] Watford, M. et al.; “*Hepatic Glutamine Metabolism*”; J. Nutr. Biochem; 18; 301-303; 2002
- [23] Gaine, S.; Rubin, L.; “*Primary Pulmonary Hypertension*”; Lancet; 352; 25-719; 1998
- [24] Conraads, V.; Bosmans, J.; Vrints, C.; “*Chronic heart failure: an example of systemic chronic inflammatory disease resulting in cachexia*”; International Journal of Cardiology; 85; 33-49; 2002
- [25] Anker, S.; Coats, A.; “*Cardiac Cachexia: A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation*”; CHEST; 115; 836-847; 1999
- [26] Sharma, R.; Anker, S.; “*Cardiac cachexia is a world-wide problem*”; International Journal of Cardiology; 71; 113-114; 1999

- [27] Anker, S.; Sharma, R.; “*The syndrome of cardiac cachexia*”; International Journal of Cardiology; 85; 51-66; 2002
- [28] Haehling, S.; Lainscak, M.; Springer, J.; Anker, S. D.; “*Cardiac cachexia: A systematic overview*”; Pharmacology & Therapeutics; 121; 227–252; 2009
- [29] Strassburg, S.; Springer, J.; Anker, S.; “*Muscle wasting in cardiac cachexia*”; International Journal of Biochemistry & Cell Biology; 37; 1938-1947; 2005
- [30] Evans, W. J. et al.; “*Cachexia: A new definition*”; Clinical Nutrition; 27; 793-799; 2008
- [31] <http://www.flickr.com>
- [32] Kotler, D. P.; “*Cachexia*”; Ann Intern. Med; 133; 622-634; 2000
- [33] Rebordão, M. et al; “*Estudo de citocinas de linfócitos T e de imunoglobulinas E e G em doentes atópicos candidatos a imunoterapia*”; Revista Portuguesa de Imunoalergologia; 11; 370-379; 2003
- [34] Witte, K.; Clark, A.; “*Nutritional abnormalities contributing to cachexia in chronic illness*”; International Journal of Cardiology; 85; 23–31; 2002
- [35] Mustafa, I.; Leverve, X., “*Metabolic and nutritional disorders in cardiac cachexia*”; Nutrition; 17; 756-760; 2001

- [36] Phoelman, J. et al; “*Special considerations in design of trials with elderly subjects: unexplained weight loss, body composition and energy expenditure*”; J. NUTR.; 10; 52-56; 1999
- [37] Niebauer, J.; “*Cardiac cachexia: time for intervention trials*”; International Journal of Cardiology; 85; 121 –124; 2002
- [38] Handeback, D. et al.; “*Reversibility of cardiac cachexia after heart transplantation*”; J. Heart and Lung Transplant; 10; 56-60; 2005
- [39] Gonçalves, A.; Melo, T.; “*Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*”; Imprensa da Universidade de Coimbra; 2007
- [40] Gil, V.; Geraldes, C.; “*Ressonância Magnética Nuclear – Fundamentos, métodos e aplicações*” (2ª edição); Fundação Calouste Gulbenkian; 2002
- [41] Luzyanin, K.; Abrantes, M.; “*Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta versátil em Química Farmacêutica e Imagiologia Médica*”; Boletim da SPQ; 117; 25-30; 2010
- [42] Mason, G. et al; “*Aplicações da ressonância magnética para medidas espectroscópicas da neurotransmissão*”; Rev. Bras. Psiquiatria; 23; 6-10; 2001
- [43] Holzgrabe, U.; Diehl, B. W.; Wawer, I.; “*NMR spectroscopy in pharmacy*”; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 17; 557-616; 1998

- [44] Szczepaniak, L. et al.; “*Measurement of intracellular triglyceride stores by  $^1\text{H}$  spectroscopy: validation in vivo*”; Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.; 276; 977-989; 1999
- [45] Perdigoto, R. et al.; “*Integration of  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$  glucose and  $^2\text{H}_2\text{O}$  for quantification of hepatic glucose production and gluconeogenesis*”; NMR Biomed.; 16; 189-198; 2003
- [46] Lourenço, A. et al.; “*Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodelling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats*”; Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.; 291; 1587-1594; 2006
- [47] Falcão-Pires, I. et al.; “*Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension*”; Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.; 296; H2007-H2014; 2009